



UNIVERSIDADE DO VALE DO TAQUARI – UNIVATES
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU*
MESTRADO EM BIOTECNOLOGIA - PPGBiotec

**INVESTIGAÇÃO DO EFEITO DE LICOFELONE E DE SUA
ASSOCIAÇÃO COM DOXORRUBICINA EM CÉLULAS DE
ADENOCARCINOMA DE PRÓSTATA LNCaP**

Bruna Caye

Lajeado, fevereiro de 2018

Bruna Caye

**INVESTIGAÇÃO DO EFEITO DE LICOFELONE E DE SUA
ASSOCIAÇÃO COM DOXORRUBICINA EM CÉLULAS DE
ADENOCARCINOMA DE PRÓSTATA LNCaP**

Dissertação apresentada para obtenção do
título de Mestre em Biotecnologia em Saúde
do Programa de Pós-Graduação em
Biotecnologia da Universidade do Vale do
Taquari – Univates.

Orientadora: Dra. Márcia Inês Goetttert

Lajeado, fevereiro de 2018

Bruna Caye

INVESTIGAÇÃO DO EFEITO DE LICOFELONE E DE SUA
ASSOCIAÇÃO COM DOXORRUBICINA EM CÉLULAS DE
ADENOCARCINOMA DE PRÓSTATA LNCaP

A banca examinadora abaixo aprova a Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade do Vale do Taquari – Univates, como parte da exigência para a obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia em Saúde, na área de concentração Aspectos Moleculares em Processos Fisiopatológicos:

Profa. Dra. Márcia Inês Goettert –
Orientadora
Universidade do Vale do Taquari –
UNIVATES

Profa. Dra. Andreia Rosana de Moura
Valim
Universidade de Santa Cruz do Sul

Profa. Dra. Luísa Scheer Ely
Universidade do Vale do Taquari –
UNIVATES

Profa. Dra. Verônica Contini
Universidade do Vale do Taquari –
UNIVATES

AGRADEDIMENTOS

Primeiramente, agradeço a minha mãe Tânia por todo o apoio, amor incondicional e torcida. Sem ela, eu nada seria, absolutamente nada.

Ao meu maior incentivador, meu querido namorado Carlos. Obrigada pela paciência, companheirismo, amor, abraços apertados e palavras de acalanto. Com certeza, tu foste fundamental nessa etapa tão importante da minha vida.

À minha irmã Pâmela, que por muitas vezes acreditou mais em mim do que eu mesma. Agradeço também pelas horas de ajuda com o meu trabalho.

Às minhas colegas do Laboratório Ouro Branco: Lisiane, Dulcinéia, Thais e Joana, muito obrigada! Sem vocês, nada disso seria possível.

À minha querida professora orientadora Dra. Márcia, o meu muito obrigada! É uma honra poder aprender diariamente com a senhora sobre cultura de células e tudo que esta envolve, mas acima de tudo, aprender diariamente o que é humildade, simplicidade e amizade. Agradeço por toda a paciência, dedicação e atenção.

Aos meus colegas do laboratório de Cultua de Células, obrigada pelo auxílio na rotina laboratorial, experimentos e pelos bons momentos que podemos dividir durante esta caminhada. As horas de descontração com certeza deixaram a rotina mais leve.

Aos meus amigos, obrigada por me incentivarem e por entenderem as minhas faltas constantes.

Aos professores da UNIVATES, obrigada por todo o ensinamento e dedicação.

À UNIVATES, pela estrutura e por poder desempenhar um trabalho tão importante.

À CAPES, pelo fomento e oportunidade de realizar o mestrado.

“Não existem sonhos impossíveis para aqueles que realmente acreditam que o poder realizador reside no interior de cada ser humano. Sempre que alguém descobre esse poder, algo antes considerado impossível torna-se realidade.”

Albert Einstein

RESUMO

O câncer é uma desordem hiperproliferativa que envolve a transformação morfológica celular, levando à desregulação da apoptose e de uma descontrolada proliferação celular. O câncer também está relacionado com a inflamação, sendo o microambiente inflamatório fundamental para a sobrevivência dos tumores. Atualmente o câncer de próstata é o quinto tumor maligno que mais acomete os homens em todo o mundo, e o segundo no Brasil. O Rio Grande do Sul e a cidade de Porto Alegre apresentam as mais altas taxas de incidência e mortalidade desta doença entre os estados e capitais do Brasil. Com base no exposto acima, há uma crescente e constante busca por novas alternativas e terapias para o tratamento do câncer de próstata. O presente trabalho teve como objetivo investigar o efeito do anti-inflamatório Licofelone (ML3000) assim como a sua associação com o quimioterápico Doxorrubicina frente a células de adenocarcinoma de próstata LNCaP, e sua ação em macrófagos murinos RAW 264.7. A metodologia consiste no cultivo celular, avaliação da viabilidade celular através do teste de MTT em ambas linhagens celulares. Além disso, realizou-se o teste de contagem direta com azul de Trypan, acompanhamento do crescimento celular, migração celular, expressão proteica de p38- α , caspase-3 e COX-2 na linhagem LNCaP, e a avaliação da inibição da citocina pro-inflamatória TNF- α na linhagem RAW 264.7. Nos testes de MTT e contagem direta com azul de Trypan, realizados na linhagem LNCaP, pode-se observar uma diminuição da viabilidade celular nas concentrações de doxorrubicina 1 e 0,1 μ M, assim como quando associada ao ML3000 em 10 μ M. Nota-se, também, que as respostas ao tratamento com os fármacos são dose e tempo dependentes. A expressão de p38- α e caspase-3 se apresentou diminuída, tanto na concentração de doxorrubicina em 0,1 μ M assim como na associação com ML3000 em 10 μ M. A respeito do teste de migração, não houve diferença estatística quanto aos tratamentos. Na linhagem RAW 264.7, os fármacos em estudo não diminuíram a viabilidade celular em 24 horas de tratamento, assim como não tiveram efeito sobre a inibição da produção de TNF- α . A avaliação do crescimento e da morfologia das células LNCaP, sugere uma diminuição da sua proliferação após 72 horas de tratamento, porém não foi possível propor um mecanismo de ação conclusivo para elucidar a diminuição da proliferação observada nas imagens. Diante destes resultados, a importância de testes complementares deve ser ressaltada para futura elucidação dos mecanismos envolvidos na diminuição da proliferação celular, assim como a diminuição da expressão de p38- α e de caspase 3.

Palavras-chave: Câncer de próstata. ML3000. Doxorrubicina. LNCaP. RAW 264.7.

ABSTRACT

Cancer is a hyperproliferative disorder that involves cellular morphological transformation, leading to the deregulation of apoptosis and uncontrolled cell proliferation. Cancer is also related to inflammation, and the inflammatory microenvironment is imperative for the survival of tumors. Currently prostate cancer is the fifth most malignant tumor that affects men worldwide, and the second in Brazil. Rio Grande do Sul and the city of Porto Alegre have the highest rates of incidence and mortality of this disease among the states and capitals of Brazil. Based on the above, there is an increasing and constant search for new alternatives and therapies for the treatment of prostate cancer. The aim of the present study is to investigate the effect of the anti-inflammatory Licofelone (ML3000) as well as its association with the chemotherapy Doxorubicin against prostate adenocarcinoma cells LNCaP, and its action on murine macrophages RAW 264.7. The methodology consists of cell culture, evaluation of the cellular viability through the MTT assay in both cell lines. Moreover, the direct count test with Trypan blue, cell growth monitoring, cell migration, protein expression of p38- α , caspase-3 and COX-2 in the LNCaP line, and the evaluation of the inhibition of proinflammatory cytokine TNF- α in RAW 264.7 cell line were performed. In the tests of MTT and direct counting with Trypan blue, carried out in the LNCaP cell line, it can be observed a decrease of cellular viability in the concentrations of doxorubicin 1 and 0,1 μ M, as well as when associated with the ML3000 in 10 μ M. It is also noted that the responses to treatment with the drugs are dose and time dependent. The expression of p38- α and caspase-3 is decreased, both in the doxorubicin concentration at 0.1 μ M as well as in the association with ML3000 at 10 μ M. Regarding the migration test, there was no statistical difference regarding the treatments. In the RAW 264.7 strain, the studied drugs did not decrease cell viability within 24 hours of treatment, nor did they have an effect on the inhibition of TNF- α production. The evaluation of the growth and morphology of LNCaP cells suggests a decrease in their proliferation after 72 hours of treatment, but it was not possible to propose a conclusive mechanism of action to elucidate the decrease of the proliferation observed in the images. In view of these results, the importance of complementary tests should be highlighted for future elucidation of the mechanisms involved in the reduction of cell proliferation, as well as the reduction of p38- α and caspase 3 expression.

Keywords: Prostate cancer. ML3000. Doxorubicin. LNCaP. RAW 264.7.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Tipos de inflamação em Tumorigênese e Câncer.....	24
Figura 2 - Marcas emergentes e ativação característica do câncer	25
Figura 3 - Polarização de macrófagos e sua função	27
Figura 4 - Screening inicial da avaliação da viabilidade celular da linhagem LNCaP através do método de MTT após 48h de tratamento.....	39
Figura 5 - Avaliação da viabilidade celular da linhagem LNCaP através do método de MTT após 48h de tratamento	40
Figura 6 – Avaliação da citotoxicidade da linhagem LNCaP pelo método de exclusão de Azul de Trypan, 48h de tratamento.	41
Figura 7 - Avaliação do crescimento celular da linhagem LNCaP após tratamento com os fármacos em estudo, assim como sua associação	43
Figura 8 - Avaliação da viabilidade celular da linhagem LNCaP através do método de MTT, após 72h de tratamento	44
Figura 9 - Avaliação da citotoxicidade da linhagem LNCaP pelo método de exclusão de Azul de Trypan, após 72h de tratamento.....	45
Figura 10 - Avaliação da viabilidade celular da linhagem LNCaP através do método de MTT. Comparação entre os tratamentos de 48 e 72 horas.	46
Figura 11 - Avaliação da citotoxicidade da linhagem LNCaP pelo método de exclusão de Azul de Trypan. Comparação entre os tratamentos de 48 e 72 horas	47
Figura 12 - Avaliação da capacidade de migração da linhagem LNCaP após 72 horas de tratamento	49
Figura 13 - Avaliação da expressão proteica de p-38 α na linhagem LNCaP após 72 horas de tratamento	50
Figura 14 - Avaliação da expressão proteica de caspase-3 na linhagem LNCaP após 72 horas de tratamento	52
Figura 16 - Avaliação da viabilidade celular da linhagem RAW 264.7 através do método MTT, 24h de tratamento	52
Figura 17 – Avaliação da capacidade de inibição de TNF- α da linhagem RAW 264.7 após 24h de tratamento.	53

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5-LOX	5-lipoxigenase
AINEs	Medicamentos anti-inflamatórios não esteroidais
APS	Persulfato de amônio
ATF2	Fator de transcrição 2
BCRJ	Banco de Células do Rio de Janeiro
BSA	Soro de albumina bovina
c-JUN	Fator de transcrição – proteína c-JUN
CaP	Câncer de próstata
CN	Controle negativo
COX	Ciclooxygenase
CP	Controle positivo
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DOXO	Doxorrubicina
ELISA	Ensaio de imunoabsorção enzimática
ER β	Receptor de Estrogênio Beta
IF	Interferon
IL	Interleucina
INCA	Instituto Nacional do Câncer
iNOS	Enzima Óxido Nítrico Sintase Induzível
LPS	Lipopolissacarídeo
MAPK	Proteína-quinase ativada por mitógenos
ML3000	Licofelone

MTT	Brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio]
NS	Não significativo
p38- α	Proteína quinase ativada por mitógeno α
ROS	Espécies Reativas de Oxigênio
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida-dodecil sulfato de sódio.
SFB	Soro fetal bovino
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral α
TRAF1	Receptor do fator de necrose tumoral associado ao fator 1
TRAF2	Receptor do fator de necrose tumoral associado ao fator 2
VEGF	Fator de Crescimento Endotelial Vascular

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
1.1 Tema	14
1.2 Problema	14
1.3 Hipótese	14
1.4 Objetivos	15
1.4.1 Objetivos específicos	15
1.5 Justificativa	16
2. REFERENCIAL TEÓRICO	18
2.1 Câncer	18
2.2 Câncer de próstata	19
2.3 Tratamentos para o câncer de próstata	20
2.4 Inflamação e câncer	22
2.5 Marcadores biológicos	26
2.6 Fator de Necrose Tumoral- α	27
2.7 MAPK p38- α	28
2.8 Caspase-3	30
3. PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS	32
3.1 Linhagens celulares	32
3.2 Reagentes	33
3.3 Viabilidade celular	33
3.3.1 Avaliação da viabilidade celular <i>in vitro</i> de células tumorais de próstata LNCaP	33
3.3.2 Avaliação da citotoxicidade pelo método de exclusão com azul de Trypan	34

3.4	Avaliação da migração celular.....	35
3.5	Avaliação da expressão proteica de P38- α , Caspase-3 e COX-2 pelo método de <i>Western Blotting</i>	35
3.6	Avaliação da inibição de TNF- α	36
3.7	Análises Estatísticas	37
4.	RESULTADOS	38
4.1	Investigação da viabilidade celular <i>in vitro</i> de células tumorais de próstata LNCaP tratadas com ML3000 e doxorrubicina após 48 horas de tratamento	38
4.2	Análise da viabilidade celular após 48 horas de tratamento.....	39
4.3	Investigação do efeito citotóxico de ML3000 e doxorrubicina por contagem direta com azul de Trypan após 48 horas de tratamento	40
4.4	Crescimento celular.....	41
4.5	Análise da viabilidade celular após 72 horas de tratamento.....	43
4.6	Investigação do efeito citotóxico de ML3000 e doxorrubicina por contagem direta com azul de Trypan após 72 horas de tratamento	44
4.7	Análise da migração celular	48
4.8	Análise da expressão de p38- α	50
4.9	Análise da expressão de Caspase-3	51
4.10	Análise da viabilidade celular após 24 horas de tratamento das células RAW 264.7	52
4.11	Avaliação da inibição de TNF- α em células RAW 264.7.....	53
5.	DISCUSSÃO	54
6.	CONCLUSÃO	61

1. INTRODUÇÃO

O câncer de próstata (CaP) é o câncer masculino mais comum em países ocidentalizados com cerca de 1,1 milhão de homens diagnosticados em 2012 em todo o mundo (STEWART; WILD, 2014). O Brasil está entre os países com alta taxa de incidência, sendo que o número de acometidos pelo câncer de próstata aumenta com o passar dos anos (INCA, 2018). Diversos fatores são apontados como determinantes, dentre eles, evidenciam-se a maior expectativa de vida da população e as constantes campanhas de identificação da doença, as quais revelam um número crescente de homens acometidos pelo câncer de próstata (DOAT et al., 2017).

Grande parte da literatura tem abordado o papel dos polimorfismos genéticos em vias de inflamação e a produção de citocinas inflamatórias em relação ao risco e promoção do câncer de próstata (SFANOS; de MARZO, 2012). Assim como as causas ambientais e os fatores de risco estão associados a alguma forma crônica de inflamação, o processo inflamatório é um componente essencial de todos os tumores, porém, para alguns tipos de tumores, a relação causal direta com inflamação ainda não está comprovada (LU et al., 2006). A inflamação é um processo fisiológico e, à medida que progride, várias outras células também são ativadas e atraídas para o local por uma rede de sinalização que envolve um grande número de fatores de crescimento, citocinas e quimiocinas (WANG et al., 2012). Em relação à próstata, a causa de sua inflamação não está clara em todos os casos. Diversos fatores podem levar a tal condição, incluindo a infecção direta, refluxo urinário, trauma físico, fatores

nutricionais, estrógenos ou uma combinação de dois ou mais destes fatores (de MARZO et al., 2007).

Atualmente são oferecidos diversos tratamentos para os pacientes acometidos pelo câncer de próstata, como a conduta expectante, radioterapia, quimioterapia, hormonioterapia e cirurgia (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2017). Uma abordagem quimiopreventiva que vem recebendo atenção é o uso regular de medicamentos anti-inflamatórios não-esteróides (AINEs), pois os mecanismos propostos incluem a indução da apoptose, a inibição da angiogênese e a inibição direta do crescimento celular. Isso ocorre, parcialmente, através da inibição de ciclo-oxigenases (COXs), enzimas envolvidas na síntese de prostaglandinas (MAHMUD; FRANCO; APREKIAN, 2004). No entanto, faz-se necessária a busca por tratamentos de maior eficácia, seja com a utilização de quimioterápicos, de medicamentos anti-inflamatórios ou com a associação de drogas.

1.1 Tema

Associação do anti-inflamatório Licofelone (ML3000) e do quimioterápico doxorrubicina em células de adenocarcinoma de próstata LNCaP.

1.2 Problema

A associação de ML3000 e doxorrubicina potencializa o efeito antiproliferativo em células tumorais de próstata LNCaP?

1.3 Hipótese

O anti-inflamatório ML3000, quando associado com o quimioterápico doxorrubicina, potencializa o efeito antiproliferativo em células LNCaP.

1.4 Objetivos

Investigar o efeito de ML3000, doxorrubicina e de sua associação em células de adenocarcinoma de próstata LNCaP.

1.4.1 Objetivos específicos

O presente trabalho seguiu os seguintes objetivos específicos:

- a) Avaliar a viabilidade celular *in vitro* de células tumorais de próstata LNCaP tratadas com ML3000, doxorrubicina e com sua associação após 48 e 72 horas;
- b) Avaliar a citotoxicidade de ML3000, doxorrubicina e sua associação em LNCaP com o teste de contagem direta com azul de Trypan após 48 e 72 horas de tratamento;
- c) Avaliar a ação de ML3000, doxorrubicina e sua associação frente à morfologia das células LNCaP;
- d) Avaliar a ação de ML3000, doxorrubicina e sua associação em LNCaP, frente ao crescimento pelo teste de migração celular;
- e) Analisar a expressão de p38- α e Caspase-3 em células LNCaP tratadas com as drogas em estudo, assim como a sua associação.
- f) Avaliar a viabilidade celular *in vitro* de macrófagos murinos RAW264.7 tratados com ML3000, doxorrubicina e com sua associação após 24 horas de tratamento;

g) Analisar a inibição da produção de TNF- α em células RAW264.7 tratadas com as drogas em estudo, assim como sua associação.

1.5 Justificativa

A biotecnologia proporciona atualmente novas oportunidades para que se desenvolvam métodos de prevenção, detecção e de tratamento para o câncer de próstata. A evolução dessa neoplasia está relacionada à ação de andrógenos nos receptores nucleares do epitélio prostático normal e resulta na expressão de genes-alvos determinados por diferentes mecanismos (WROCLAWSKI; NETO, 2010). Homens com câncer de próstata avançado são normalmente tratados com terapias de retirada do andrógeno, sendo que a maioria responde inicialmente ao tratamento, porém, a doença evolui e se torna resistente à terapia adicional hormonal. As metástases, especialmente nos ossos e glândulas linfáticas, também são frequentes, causando dor e outros sintomas que levam ao comprometimento da qualidade de vida (BERTHOLD et al., 2008).

Com relação ao tratamento quimioterápico, frequentemente utilizado no combate aos cânceres, diversos esquemas têm sido utilizados em cânceres avançados ou metastáticos da próstata, porém, os resultados não são animadores (TONON; SCHOFFEN, 2009). Em 2004, a droga Docetaxel se tornou o primeiro agente quimioterápico que apresentava melhores resultados quanto à sobrevivência em pacientes com câncer metastático resistente à castração prostática, estabelecendo o Docetaxel como tratamento padrão para os mesmos (PETRYLAK et al., 2015). Outra abordagem quimiopreventiva que vem recebendo atenção é o uso regular de AINEs, onde ocorre a inibição de COXs, enzimas envolvidas na síntese da prostaglandina. O aumento da expressão da COX-2, que está envolvida na angiogênese, tem sido observado em células cancerosas humanas da próstata, e níveis mais elevados de prostaglandinas têm sido detectados em comparação com tecidos benignos da próstata (DOAT et al., 2017; MAHMUD et al., 2004). Além disso,

vários estudos epidemiológicos revelaram um risco reduzido de câncer da próstata com o uso de AINEs, possivelmente pela inibição da enzima COX-2 (SFANOS; de MARZO, 2012). O ML3000 é caracterizado como um inibidor competitivo de duplo ciclo-oxigenases (COX-1 e COX-2) e 5-lipoxigenase (5-LOX). Diversos estudos experimentais têm indicado que o ML3000 tem ação analgésica, anti-inflamatória, antiasmática, antiplaquetária e apresenta maior segurança gastrointestinal do que os fármacos AINEs tradicionais (PAYANDEMEHR et al., 2015). Sendo assim, a utilização de apenas uma droga ou a associação de várias drogas vem sendo proposta, entretanto, até o momento não se pode concluir quanto a sua eficácia (TONON; SCHOFFEN, 2009). Acredita-se ainda que a associação de ML3000 com o quimioterápico possa ser uma nova estratégia terapêutica para pacientes acometidos com o câncer de próstata.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Câncer

O câncer é uma desordem hiperproliferativa que envolve a transformação morfológica celular, levando à desregulação da apoptose e a uma descontrolada proliferação celular (LIN; KARIN, 2007). Os mecanismos envolvidos no desenvolvimento do câncer estão associados a um sistema imunológico disfuncional, que se torna incapaz de detectar ou eliminar células pré-cancerosas em estágio inicial. O dano do sistema imunológico, que elimina patógenos e células indesejadas, como células senescentes, danificadas ou imaturas em condições fisiológicas normais, é uma estratégia muito comum que os cânceres utilizam para beneficiar seu crescimento e a sobrevivência contra recursos locais limitados. As células cancerosas secretam várias citocinas, fatores de crescimento e receptores de citocinas (LIOU, 2017).

A multiplicação das células tumorais é denominada como carcinogênese, caracterizada por mutações genéticas herdadas ou adquiridas devido a agentes ambientais, químicos, hormonais, radioativos e virais, que são denominados carcinógenos. A carcinogênese compreende alguns estágios, entre eles a iniciação, que se caracteriza pela exposição das células aos carcinógenos com consequente mutação e formação de clones celulares atípicos, e a promoção, que se caracteriza pela multiplicação desses clones celulares. A progressão e a conversão maligna das

células compõem respectivamente o terceiro e o quarto estágios da carcinogênese. Neles, as células transformadas apresentam autonomia para proliferar e, pela perda da coesão e obtenção da mobilidade, tornam-se invasivas (SILVA; SERAKIDES; CASSALI, 2004). Com a constante multiplicação celular, há a necessidade da formação de novos vasos sanguíneos para o aporte nutricional destas células, em um processo denominado angiogênese, sendo este evento fundamental para a proliferação celular (POORNIMA et al., 2014).

As alterações que geram as neoplasias podem ocorrer em genes especiais, denominados protooncogenes, inativos em células normais. Quando ativados, transformam-se em oncogenes, responsáveis pelas mutações das células normais, denominadas então cancerosas ou tumorais, multiplicando-se de maneira descontrolada (ALMEIDA et al., 2005). Além disso, uma minoria de todos os cânceres é causada por mutações germinativas, ao passo que a grande maioria (90%) está associada a mutações somáticas e fatores ambientais (MAHMUD; FRANCO; APREKIAN, 2004).

2.2 Câncer de próstata

O câncer de próstata é a neoplasia maligna mais comum em homens nos países ocidentais (RAMOS-MONTOYA et al., 2014). Para o Brasil, estimam-se 68.220 casos novos de câncer de próstata para cada ano do biênio 2018-2019. Esses valores correspondem a um risco estimado de 66,12 casos novos a cada 100 mil homens. Sem considerar os tumores de pele não melanoma, o câncer de próstata é o mais incidente entre os homens em todas as Regiões do país, com 96,85/100 mil na Região Sul, 69,83/100 mil Região na Sudeste, 66,75/100 mil na Região Centro-Oeste, 56,17/100 mil na Região Nordeste e 29,41/100 mil na Região Norte (INCA, 2018). O histórico familiar, conforme a incidência de casos, pode aumentar em até 10 vezes a probabilidade de desenvolver a doença, quando comparados com aqueles que não possuem histórico familiar (DANIYAL et al., 2014).

A inflamação crônica tem contribuído significativamente para o início e a progressão de um amplo espectro de doenças malignas, como o câncer de próstata. A perda de funções associadas a mutações e certos polimorfismos, assim como histórico de prostatite, foram positivamente correlacionados com o risco de câncer de próstata (KWON et al., 2013). Estudos demonstram que a imunoexpressão do fator de necrose tumoral α (TNF- α) e seus receptores (TNFRI e TNFRII) em amostras de câncer de próstata estão aumentados em comparação com amostras de próstata normal. Estes dados vão ao encontro com os resultados de vários estudos, por exemplo, em tecidos de leucemia, em que a presença de níveis elevados de TNF- α foi associada com prognóstico de resistência às terapias convencionais (RICOTE et al., 2006). Inclusive, estudos em diferentes tipos de câncer sugeriram uma relação entre COX-2 e fatores de crescimento pro-angiogênicos aumentados, em particular VEGF (YAO et al. 2012).

2.3 Tratamentos para o câncer de próstata

Atualmente, de acordo com o *American Cancer Society*, na maioria dos casos, o primeiro medicamento quimioterápico administrado é o docetaxel, combinado com a droga esteróide prednisona. Nos casos em que esta combinação não apresentar o efeito esperado, ou mesmo sua ausência, o cabazitaxel é o quimioterápico alternativo a ser utilizado. Ambas as drogas demonstraram um aumento na expectativa de vida de pacientes tratados, podendo retardar a progressão e desenvolvimento do câncer, reduzindo os sintomas e resultando em uma melhor qualidade de vida. Os quimioterápicos são administrados em ciclos, com períodos de tratamento seguidos por um período de descanso, onde cada ciclo geralmente dura algumas semanas (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2017). Ainda, SHU et al. (2017) apontam a eficiência da doxorubicina no tratamento do CaP, assim como a resistência que algumas células cancerígenas apresentam, enfatizando a importância pela busca de novas propostas terapêuticas.

Neste contexto, a quimioterapia é considerada uma das principais alternativas no tratamento tardio, a fim de evitar a recorrência de câncer após cirurgia. Desde a

sua descoberta e introdução na quimioterapia experimental, a doxorubicina também tem contribuído para a melhoria da expectativa de vida de inúmeros pacientes afetados por carcinomas, sarcomas ou linfomas (POORNIMA et al., 2014). Um grande número de mortes por câncer está relacionado aos tumores que tenham metastatizado e/ou se tornaram resistentes à quimioterapia. A ocorrência de múltipla resistência à droga torna as células tolerantes não só ao fármaco utilizado na quimioterapia, mas também as modifica estruturalmente e funcionalmente (EL-READI et al., 2009). Embora a doxorubicina tenha se mostrado uma droga eficaz no tratamento do câncer, seu efeito cardiotoxico e a resistência do tumor frente a esta droga se tornaram obstáculos consideráveis. Os efeitos intracelulares da doxorubicina incluem a formação de radicais livres, a inibição da topoisomerase II e também intercalação de nucleotídeos, resultando na inibição da replicação de DNA (POORNIMA et al., 2014).

Ainda, neste mesmo contexto, podemos citar novamente que o uso de alguns medicamentos no tratamento do câncer se torna limitado devido a toxicidade e a resistência às drogas. Novas estratégias são necessárias para melhorar essa eficácia e uma opção promissora é a combinação de drogas (LI et al., 2017). O uso concomitante de drogas, que agem por diferentes vias, é uma abordagem eficiente para inibir o crescimento de células tumorais (KUTKOWSKA; STRADALA; RAPAK, 2017). É possível obter resultados propícios a partir de díspares classes de medicamentos, onde podem ser usados como coadjuvantes no tratamento convencional com quimioterápicos (VALVERDE et al., 2016). Sendo assim, é importante conhecer a ação das mesmas e os mecanismos causadores de resistência, dessa forma, torna-se possível complementar o efeito de uma droga com outra, fazendo com que ocorra supressão tumoral e se impeça a ocorrência de resistência. Outra vantagem da combinação de duas drogas é manter ou potencializar o efeito antitumoral, diminuindo significativamente as doses utilizadas (LI et al., 2017).

Estudos estão relacionando medicamentos anti-inflamatórios como uma alternativa para a diminuição de efeitos colaterais no tratamento do CaP, quando associados a quimioterápicos, e até mesmo na diminuição das chances de desenvolvimento de CaP. Climent et al. (2017) sugerem que a administração de Cabazitaxel mais prednisona é efetiva e menos tóxica no tratamento de pacientes com

CaP metastático e resistente à castração, destacando que mais estudos se fazem necessários para tal confirmação. Ainda, neste contexto, um estudo de Ma e Brusselaers (2017) mostrou que a administração de aspirina, inibidor de COX-1/2, e outros AINEs, diminuem o risco de desenvolvimento de CaP, porém, neste caso, estudos se tornam necessários para que, de fato, tal afirmação se comprove.

Licofelone (ML3000) é um fármaco novo, da classe dos AINEs, inibidor das vias de COX-1/2 e 5-LOX. Se encontra em fase III de pesquisa clínica e está sendo testado para o tratamento de osteoartrite, mostrando eficácia quando administrado em via oral, em dose única ou repetida. O mesmo possui ação anti-inflamatória, analgésica, antipirética e antiasmática, sendo a primeira droga desta classe de medicamentos com ação dupla. Ainda, o ML3000 apresenta maior segurança gastrointestinal em relação a outros medicamentos (NARAYANAN et al., 2008). Ainda, a inibição de COX-1/2 e 5-LOX reduz a produção de prostaglandinas e leucotrienos, fazendo com que haja a diminuição da inflamação. Quando a via das COX-1/2 é inibida, há uma consequente diminuição da produção de prostaglandinas, porém o metabolismo do ácido araquidônico aumenta por meio da via de 5-LOX, fazendo com que ocorra um aumento na produção de leucotrienos, componentes dos processos inflamatórios e possivelmente dos danos gástricos (MANJANNA; SHIVAKUMAR, 2011).

Sendo assim, há uma maior vantagem da utilização do ML3000 quando comparado aos anti-inflamatórios tradicionais, que, na sua maioria, causam efeitos adversos aos pacientes. A utilização do ML3000 resulta em uma maior segurança gastrointestinal, sendo, desta forma, uma droga estratégica para estudos e novas abordagens terapêuticas no tratamento do câncer.

2.4 Inflamação e câncer

O processo inflamatório, relacionado ao câncer, ocorre em resposta a lesões celulares que podem resultar na liberação de mediadores inflamatórios com o objetivo final de restauração de estruturas e função dos tecidos. No entanto, por vezes, a perpetuação da inflamação pode ser prejudicial e contribui para evolução de várias

doenças. Muitas células envolvidas neste processo são células secretoras que liberam uma diversidade de mediadores, incluindo citocinas pró-inflamatórias, prostaglandinas, intermediários reativos de oxigênio e óxido nítrico (PINHEIRO et al., 2013).

Também, a inflamação crônica associada a infecções ou doença auto-imune precede o desenvolvimento do tumor e pode contribuir para isso através da indução de mutações oncogênicas, de instabilidade genômica, de promoção do tumor inicial e angiogênese. A exposição prolongada a substâncias irritantes, fatores ambientais ou obesidade também pode resultar em inflamação crônica de baixo grau que precede o desenvolvimento do tumor. A resposta inflamatória pode melhorar a neoangiogênese, promover a progressão tumoral e metastática, causar imunossupressão local e aumentar ainda mais a instabilidade do genoma. A terapia do câncer também pode desencadear uma resposta inflamatória, causando trauma, necrose e lesão tecidual, que estimulam a re-emergência tumoral, levando à resistência à terapia. No entanto, em alguns casos, a inflamação induzida por terapia pode melhorar a apresentação do antígeno, levando a erradicação do tumor mediada por sistema imune (DANIYAL, 2014; DIAKOS, 2014; GRIVENNIKOV et al., 2010). (FIGURA 1)

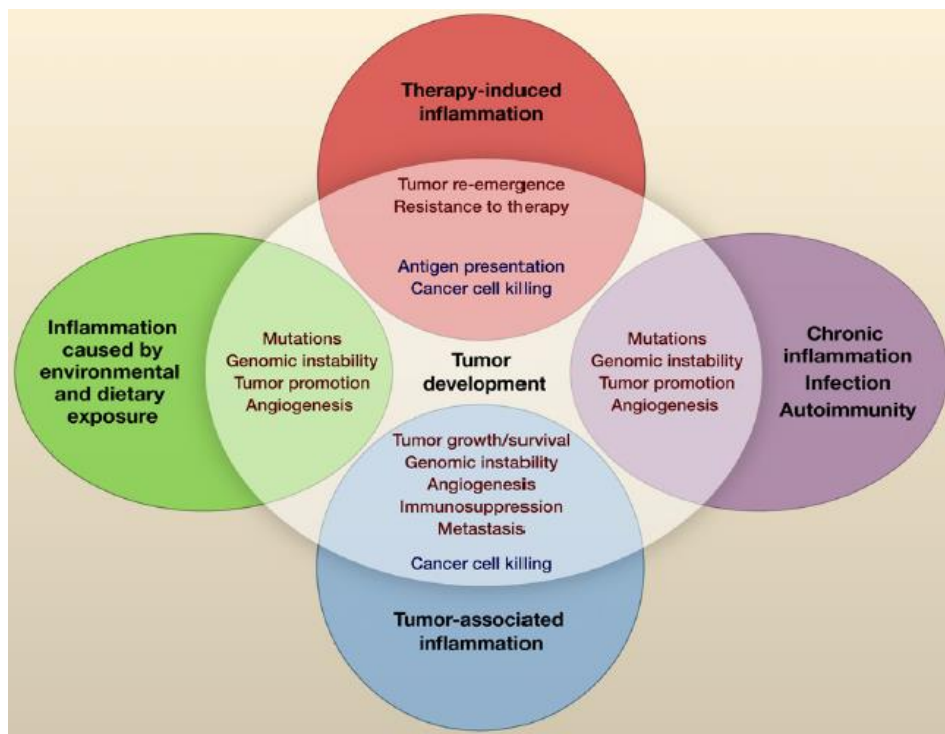


Figura 1 - Tipos de inflamação em Tumorigênese e Câncer. Fonte: GRIVENNIKOV et al., 2010

Envolvidas em processos inflamatórios, podemos citar também as ciclo-oxigenases COX1/2, que são enzimas que participam na produção de prostaglandina E₂ e são frequentemente sobre-expressas em câncer de colo-retal, de mama, de estômago, de pulmão e de pâncreas (ZELENAY et al., 2015). A inibição da COX-1/2 pelos AINEs neutraliza a inflamação, febre e dor. No entanto, a aplicação a longo prazo de inibidores de COX-1/2 durante doenças crônicas induz efeitos secundários graves, como lesões gastrointestinais e irritações renais. Drogas seletivas de COX-2 (coxibes) poderiam resolver as complicações gastrointestinais, mas foram confrontados por um pequeno, mas significativo, aumento do risco cardiovascular em condições de utilização a longo prazo (KORBERLE e WERZ, 2014). Diversas evidências suportam a ideia do papel da COX-2 na inflamação e oncogênese. A alta expressão de COX-2 está associada à apoptose celular, a ocorrência do tumor e ao desenvolvimento da invasão. Já a inibição da COX-2 tem demonstrado suprimir o crescimento tumoral e metástases nos linfonodos mostrando ser uma estratégia eficaz para o tratamento do câncer (XUAN et al., 2016).

Além disso, segundo Hanahan e Weinberg (2011) duas características da neoplasia facilitam a sua proliferação, sendo a instabilidade genômica e a inflamação. A mutabilidade proporciona células cancerosas com alterações genéticas que impulsionam a progressão do tumor. Já na inflamação, células imunes inatas projetadas para combater infecções e curar feridas podem inverter o seu papel, propiciando assim um ambiente inflamatório que pode ser essencial para o desenvolvimento tumoral (FIGURA 2).

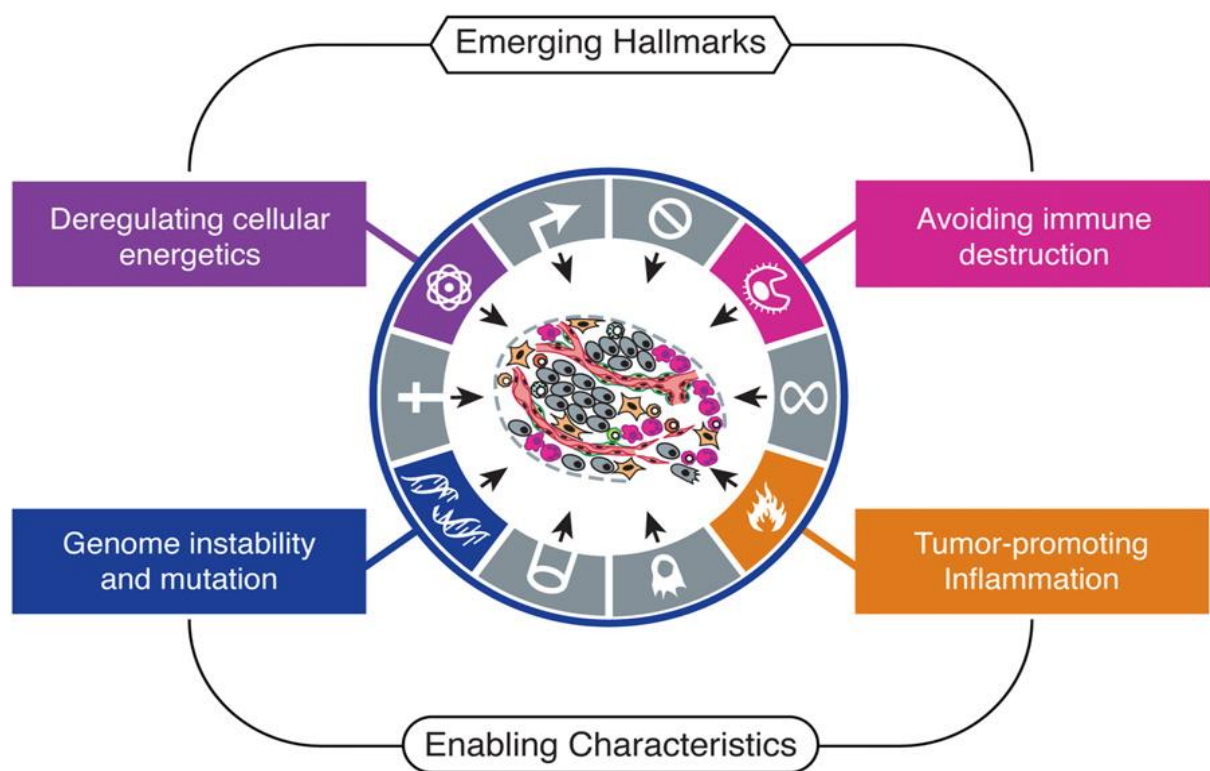


Figura 2 - Marcas emergentes e ativação característica do câncer. Fonte: HANAHAN E WEINBERG (2011)

Em conjunto, evidências epidemiológicas, biológicas, genéticas e experimentais sugerem que a inflamação crônica pode estar associada com a iniciação e progressão de vários tipos de câncer, incluindo o CaP. De fato, células inflamatórias, bem como as quimiocinas e citocinas, conferem um microambiente favorável para o crescimento e desenvolvimento tumoral, aumentando a produção de

espécies reativas de oxigênio, levando ao dano oxidativo do DNA, reduzindo seu reparo e promovendo a angiogênese (DOAT et al., 2017; SFANOS; de MARZO, 2012).

2.5 Marcadores biológicos

As citocinas são produzidas principalmente por células imunes como monócitos, linfócitos e macrófagos, que são essenciais na coordenação da resposta imune, dependendo do seu papel, são classificadas como pró-inflamatórias: interleucina (IL) IL1, IL12, IL18, interferon (IFN) gama (IFN- γ) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), ou anti-inflamatórias: IL-4, IL-10, IL-13 e IFN- α ; (RODNEY et al., 2018). Os níveis de citocinas e seus receptores (mais frequentemente de citocinas pró-inflamatórias circulantes) se apresentaram aumentados em um estudo observacional em pacientes com vários tipos de câncer, tanto no diagnóstico da doença primária quanto em pacientes com metástases, em comparação com pessoas saudáveis e pessoas com tumores benignos (VOLP et al., 2010).

Segundo CHANMEE et al. (2014) os macrófagos são derivados de monócitos circulantes e adquirem um fenótipo M1 clássico ou M2 alternativo, dependendo dos estímulos ambientais. O fenótipo M1 é conduzido pelo IFN- γ e lipopolissacarídeo (LPS), e produz altos níveis das citocinas pró-inflamatórias e TNF- α . O fenótipo M2 pode ser subdividido em M2a, M2b, M2c e M2d de acordo com diferentes estímulos. Os macrófagos M2 geralmente produzem um alto nível de IL-10. O fenótipo M1 gera respostas pró-inflamatórias, citotóxicas e antitumorais. Em contraste, o fenótipo M2 promove angiogênese, imunossupressão e progressão tumoral (FIGURA 3).

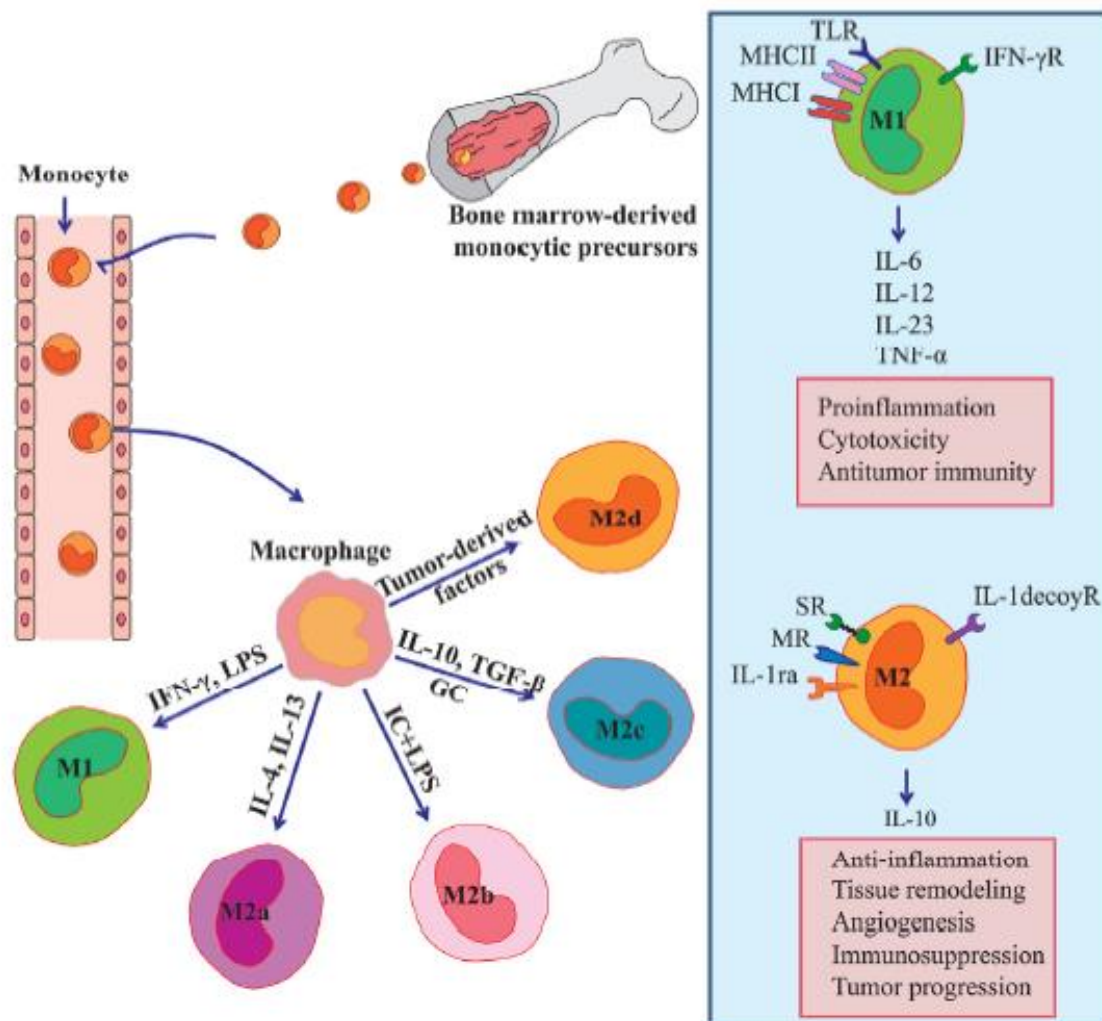


Figura 3 - Polarização de macrófagos e sua função. Fonte: CHANMEE et al., 2014.

2.6 Fator de Necrose Tumoral- α

O TNF- α é um mediador do processo inflamatório que é secretado por monócitos, macrófagos, neutrófilos, células T e células NK após a estimulação, também pode desempenhar um papel importante no desenvolvimento da resposta imune, podendo afetar a progressão do CaP (MA et al., 2014). Ainda, esta citocina é um potente estimulador da expressão das moléculas de adesão (VOLP et al., 2010).

A busca de abordagens terapêuticas eficazes na modulação do TNF- α vem sendo foco de investigação, no entanto, os mecanismos envolvidos na produção desta citocina e a sua atividade sobre as células ainda necessitam uma melhor compreensão. Desta forma, estão surgindo mais estratégias específicas para a sua inibição, exemplos incluem o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos e a modificação de sistemas existentes, procurando menor toxicidade e maior potencial terapêutico (BARBOSA et al., 2011). Portanto, o papel do TNF- α em doenças inflamatórias crônicas é bem estabelecido, assim como seus efeitos de iniciação de tumores têm sido amplamente demonstrados. Nos casos de desenvolvimento de câncer, as células no microambiente inflamatório podem promover a sobrevivência de células tumorais através da indução de, por exemplo, genes codificados do NF- κ B (LIN; KARIN, 2007). Esta citocina exibe papéis paradoxais na evolução e tratamento do câncer, pois vários estudos revelaram que o TNF- α está envolvido nas interações do crescimento de células tumorais e do estroma, que facilitam a invasão tumoral e metástase (RICOTE et al., 2006). Muitas causas ambientais relacionadas ao câncer e fatores de risco estão associadas a alguma forma de inflamação crônica e, aproximadamente, 20% dos cânceres são ligados a infecções crônicas. Junto com seus efeitos pró-tumorigênicos, a inflamação também influencia a resposta imunológica do hospedeiro para tumores e pode ser utilizada na imunoterapia do câncer, além de poder aumentar a resposta à quimioterapia (GRIVENNIKOV; GRETEN; KARIN, 2010). Torna-se cada vez mais evidente que, para doenças complexas, como a inflamação, uma interferência com múltiplos alvos é superior à destinada a um único alvo. Esforços têm sido feitos para se obter drogas potentes e específicas, as quais devem combinar uma elevada eficácia terapêutica com menores efeitos colaterais (KOEBERLE; WERZ, 2014).

2.7 MAPK p38- α

A MAPK p38- α desempenha um papel crucial na sinalização da cascata de transdução, biossíntese, regulação e liberação de citocinas pró-inflamatórias por meio

da ativação de fatores de transcrição, como ATF-2 e de c-Jun (SCHINDLER; MONAHAN; SMITH, 2007). Foi estabelecida uma importante ligação entre a via de ativação p38- α e inflamação, pois a ativação desta via desempenha um papel essencial na produção de citocinas pró-inflamatórias, indução de enzimas, como COX-2, expressão de enzimas intracelulares, como iNOS (regulador de oxidação), indução de proteínas aderentes, juntamente com outras moléculas relacionadas a inflamação. Além disso, a p38- α tem um papel na tumorigênese e senescência (ZARUBIN e HAN, 2005).

Embora os mecanismos envolvidos no desenvolvimento e na progressão do câncer de próstata não estejam completamente compreendidos, alguns deles incluem MAPKs, em particular, p38- α , que foi relatada em seu envolvimento em células de câncer de próstata, onde controla diversas funções celulares, incluindo a apoptose (GIL-ARAUJO et al, 2014).

A p38- α é ativada por diversos fatores ambientais e citocinas inflamatórias, controlando inúmeras funções celulares, incluindo ciclo celular e proliferação. Além do seu envolvimento no câncer de próstata, demonstrou-se que a ativação de p38- α , no mieloma múltiplo, promove o fenótipo destrutivo e osteolítico de metástases ósseas, interferindo na diferenciação e recrutamento de osteoblastos e osteoclastos. No câncer de próstata, a atividade de p38- α é desregulada, levando à tumorigênese e à supressão tumoral (BROWNE et al, 2016).

Ainda, a via da p38- α regula o equilíbrio entre a sobrevivência celular e morte celular com efeitos diretos no desenvolvimento de vários tipos de câncer. Os sinais de p38- α podem resultar em moléculas com funções opostas no desenvolvimento de tumores, ou seja, esta MAPK pode desempenhar um duplo papel: mediar a sobrevivência celular ou promover a morte celular através de diferentes mecanismos (GROSSI et al, 2014).

Em um estudo de CHEN et al., (2012) os autores mostram que a via de sinalização de p38- α está envolvida na resistência induzida por doxorrubicina e que a inibição desta via diminuiria esta resistência. Ressaltam ainda que os inibidores da p38- α podem fornecer novas opções quimioterapêuticas para superar a resistência a medicamentos no tratamento do câncer.

2.8 Caspase-3

A caspase-3 consiste em um marcador biomolecular que desempenha um importante papel nas vias de ativação intrínseca (mitocondrial) e extrínseca (citoplasmática) da apoptose (NOGUEIRA et al., 2013). Em diferentes estudos, vem sendo compreendida como peça chave nos mecanismos de morte celular, pois é ativada em resposta a vários estímulos, como os quimioterápicos. A utilização de marcadores de apoptose é considerada importante, pois pode caracterizar biologicamente o tumor, sendo este fenômeno vital para a tumorigênese (EL-READI, 2010).

A apoptose, morte celular programada do tipo I, é um processo com morfologia típica característica, incluindo redução de tamanho de células, condensação de citoplasma, colapso da cromatina e fragmentação do DNA em peças de tamanho oligonucleossômico. Apoptose é o principal mecanismo para a eliminação de células desnecessárias durante o desenvolvimento e homeostase em tecido normal. Assim, a disfunção do sistema apoptótico leva à patogênese de uma variedade de doenças, incluindo o câncer. A ativação da caspase é o vínculo central na apoptose, que pode ser desencadeada para remover células com DNA danificado para prevenir tumorigênese em lesões pré-cancerosas. Uma vez que o mecanismo da apoptose esteja prejudicado, permitirá que as células cancerosas sobrevivam em suspensão e promovam a angiogênese tumoral e invasividade, que são passos cruciais para a metástase do câncer. As células tumorais também evitam mecanismos apoptóticos para adquirir resistência contra tratamentos, resultando na sua falha (FANG et al., 2016; LIU et al., 2017; WU et al., 2017).

As caspases podem ser classificadas de acordo com seu pró-domínio e sua função na apoptose. As iniciadoras (caspase-2, -8, -9, -10 e -12) apresentam pró-domínios longos e estão envolvidas na iniciação da cascata proteolítica. Já as efetoras (caspase-3 e -7), apresentam pró-domínios curtos ou inexistentes, responsáveis pela clivagem de substratos (RUONARAIN et al., 2004).

A caspase-3 é clivada em um resíduo de aspartato, quando espessa as subuniades p12 e p17, formando a enzima caspase-3 ativa. Quando ativa, a caspase-3 degrada proteínas celulares múltiplas e é responsável por mudanças morfológicas e fragmentação do DNA em células durante a apoptose (LIU et al, 2017).

3. PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS

3.1 Linhagens celulares

As células da linhagem LNCaP foram doadas pelo grupo de pesquisa do Departamento de Fisiologia, do Instituto de Ciências Básicas da Saúde, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). As células LNCaP foram mantidas em frascos de cultivo celular contendo meio RPMI 1640 suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF), antibióticos estreptomicina (0.1 mg/mL) e penicilina (0.06 mg/mL), bicarbonato (1.8 mg/mL) e mantidas a 37°C e 5% de CO₂ até atingir confluência de 80-90%. Após, a cultura celular foi lavada com solução fisiológica (cloreto de sódio a 0.9%) e, com a utilização de tripsina, removidas das garrafas de cultivo para posterior contagem em câmara de *Neubauer*. As células RAW 264.7 foram adquiridas do BCRJ (Banco de Células do Rio de Janeiro) e mantidas em meio DMEN suplementado com 10% de SBF, antibióticos estreptomicina (0.1 mg/mL) e penicilina (0.06 mg/mL), bicarbonato (1.8 mg/mL) e igualmente mantidas a 37°C e 5% de CO₂ até atingir confluência de 70%. Removidas da placa após a lavagem com o próprio meio e retiradas com a ajuda de um *scraper* (espécie de rodo que remove as células aderidas à garrafa).

3.2 Reagentes

O ML3000 foi gentilmente doado pelo professor Dr. Stefan Laufer do Departamento de Química Medicinal Farmacêutica da Universidade de Tübingen, Alemanha. O fármaco foi diluído em dimetilsulfóxido (DMSO) até a concentração estoque de 10mM e armazenado à -20°C. A doxorrubicina (98.0-102.0%, HPLC, Sigma®) foi diluída em DMSO até a concentração estoque de 10mM e armazenada à -20°C. Os meios de cultivo DMEM e RPMI-1640 foram adquiridos da Sigma® e o soro fetal bovino da Cultilab®. Os anticorpos primários utilizados foram adquiridos da Santa Cruz Biotechnology e os secundários da Cell Signalling. O MTT foi adquirido da Sigma®. Para o ensaio de liberação de TNF- α foi utilizado o kit comercial “Mouse TNF- α ELISA Ready-SET-Go!” (eBioscience®). Utilizou-se LPS/*E.coli* 0127:B8 (Sigma®) para estimulação das células.

3.3 Viabilidade celular

3.3.1 Avaliação da viabilidade celular *in vitro* de células tumorais de próstata LNCaP

O teste por MTT (brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio] (Sigma®)) é um ensaio colorimétrico para avaliar a atividade metabólica da célula. O princípio do método consiste na absorção do sal MTT pelas células, sendo ele reduzido à formazana, no interior da mitocôndria. Este produto, acumulado dentro da célula, é extraído através da adição de um solvente apropriado (MOSMANN, 1983). Para o ensaio, 3×10^3 células por poço em 200 μ L de meio RPMI completo (suplementado com SFB) para as células LNCaP e 200 μ L de meio DMEN completo por poço para as células RAW 264.7, foram adicionadas em placa de 96 poços. Após 24 horas, as células aderidas foram tratadas com ML3000 e doxorrubicina. Para células LNCaP utilizou-se os tempos de 48 e 72 horas de tratamento, já para as células RAW 264.7 utilizou-se o tempo de 24 horas de tratamento. Após o período de

incubação, o sobrenadante foi descartado e adicionados 200 µL do corante MTT (5 mg/mL, Sigma®) dissolvido em meio e novamente as células foram incubadas por 3 horas. Em seguida, o meio foi retirado cuidadosamente e adicionado 200 µL de dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma®) para solubilização dos cristais de formazana. A absorbância das amostras foi mensurada por espectrometria em leitor de microplacas (SpectraMax) a 570nm.

Para realizar os estudos subsequentes, a concentração de ML3000, a qual não veio a interferir na viabilidade celular, e a concentração inibitória de 50% (IC₅₀) determinada pelo método de MTT para a doxorrubicina, foram utilizadas para os experimentos de associação.

3.3.2 Avaliação da citotoxicidade pelo método de exclusão com azul de Trypan

O corante azul de Trypan tem a capacidade de penetrar nas células com membrana rompida corando-as de azul, enquanto as células viáveis permanecem translúcidas. Para este ensaio, 2×10^4 células foram semeadas em placa de 48 poços e após o período de adesão, foram tratadas com controle negativo (apenas meio RPMI completo), 0,1% DMSO, doxorrubicina 1 e 0,1µM, ML3000 10µM, assim como a associação dos fármacos. Após, as células foram desprendidas da placa por tripsinização e realizada a contagem com fator de diluição (FD) 2 (20 µM da suspensão celular foram adicionados à 20 µM de azul de Trypan). O número de células viáveis foi determinado pela média dos quadrantes da câmara de Neubauer, multiplicados pelo fator de diluição e fator da câmara (10^4), conforme cálculo abaixo:

$\text{Número de células viáveis} / 4 \times \text{FD} (2) \times 10^4$

3.4 Avaliação da migração celular

Para o teste de migração celular, as células foram semeadas em densidade de $2,5 \times 10^5$ em placa de 6 poços. Após atingir confluência de 80%, foi realizado um risco transversal na monocamada com o uso de uma ponteira de 200 μ L e adicionado o tratamento com doxorrubicina 0,1 μ M, ML3000 10 μ M e a associação destes. Esse risco determinou uma descontinuidade da monocamada e as células que margeiam esse risco tenderam a migrar para o espaço vazio. As placas foram fotografadas com microscópio invertido de contraste de fase (Labomed, TCM400) no aumento de 200x. As imagens obtidas foram avaliadas através do *software* TScratch (ETH Zurich) para cálculo de migração.

3.5 Avaliação da expressão proteica de P38- α , Caspase-3 e COX-2 pelo método de *Western Blotting*

Este experimento foi realizado com o método de Western Blotting (WB), onde o termo *blotting* refere-se à transferência de amostras biológicas de um gel para uma membrana e sua subsequente detecção em sua superfície. Também conhecido como *imunoblotting*, o WB é uma técnica amplamente utilizada para detecção e análise de proteínas específicas. Com o advento da eletroforese, é possível a separação de proteínas com base no tamanho, forma e/ou carga. Em termos gerais, é uma técnica de separação baseada na mobilidade de moléculas carregadas (+/-) em um campo elétrico.

Para tal, as células foram semeadas em placas de 48 poços, em densidade de 2×10^4 células por poço, contendo 400 μ L de meio RPMI 1640 completo. Após este processo, as células foram tratadas com os fármacos em estudo e mantidas por 72 horas em estufa. Para cada tratamento, realizou-se um *pool* de 4 poços, ou seja, totalizando 8×10^4 células. Após o período de tratamento, realizou-se a retirada do sobrenadante e foram adicionados às células 250 μ L de tampão de lise RIPA (1 mL

de Triton X-100, 5 mL de ortovanadato de sódio a 10 mM e 5 mL de fluoreto de sódio a 10 mM, pH 7,4) sob gelo e agitação por 30 minutos. Com auxílio de *scraper*, as células foram raspadas e removidas juntamente com o tampão RIPA e centrifugadas a 11000 rpm (rotações por minuto) por 30 minutos, a 4 °C, para obtenção da fração citosólica. O sobrenadante foi coletado e a fração de proteínas totais foi determinada utilizando método de LOWRY et al. (1951), com albumina bovina sérica (BSA) 2 mg/mL como padrão e as amostras lidas em espectrofotômetro à 750 nm (nanômetros). Um volume de 5 X de tampão da amostra (125 mM Tris-HCl, 20 % glicerol, 4 % SDS, 100 mM DTT, 0,02 % azul de bromofenol, pH 6,8) foi adicionado ao sobrenadante. A fração citosólica (aproximadamente 50 µg) foi submetida à análise em gel de poliacrilamida SDS-PAGE e eletrotransferidas (semi-seco, BioRad) para membranas de nitrocelulose. Após a transferência, a membrana foi incubada por 2 horas com uma solução de leite em pó integral (Molico, Nestlé) para a realização do bloqueio. Então, as membranas foram lavadas com solução basal (Trizma Base 10 mM, 150 mM, 0,5 mL Tween 20) e incubadas a 4 °C por 18 horas com anticorpo primário (diluição: 1:400) específico para as proteínas de interesse, sendo a β -actina utilizada como controle interno. Posteriormente, a membrana foi novamente lavada e adicionado o anticorpo secundário por 2 horas à temperatura ambiente, sob agitação (diluição 1:4000). A detecção das bandas imunorreativas foi realizada através de adição de solução reveladora caseira (6 mg OPD, sulfato de níquel 0,3%, Tris-HCl 50 mM, pH 7,6) e a quantificação da densidade óptica das bandas realizada através do programa *ImageJ 1.44*.

3.6 Avaliação da inibição de TNF- α

Para o ensaio de inibição da produção de TNF- α , as células RAW 264.7 foram semeadas na densidade de 1×10^5 células por mL em placas de 6 poços, tratadas com doxorrubicina 1 e 0,1 µM, ML3000 a 10 µM, assim como a associação destes, e incubadas por 1 hora. Após o período de incubação do tratamento, LPS (1 µg/mL) foi adicionado em cada amostra e incubado por 24 horas antes da coleta do sobrenadante para análise. As amostras coletadas foram submetidas ao teste de

ELISA. Após a adição do substrato, interrompeu-se a reação com solução “*Stop Solution*” (H₃PO₄, 1M) e as amostras foram lidas em espectofotômetro à 450 nm.

3.7 Análises Estatísticas

Os dados obtidos foram analisados através do método estatístico Análise de Variância (*ANOVA*) seguida pelo teste de Bonferroni. As análises estatísticas foram realizadas com o *software GraphPad Prism 5* sendo adotado o nível de significância de $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1 Investigação da viabilidade celular *in vitro* de células tumorais de próstata LNCaP tratadas com ML3000 e doxorrubicina após 48 horas de tratamento

Primeiramente, realizou-se o teste de viabilidade celular na linhagem LNCaP pelo método de MTT com diversas concentrações de doxorrubicina e ML3000. Partindo da concentração de 100 μ M, seriando-a até a concentração de 0,01 μ M. Pode-se observar que as concentrações de doxorrubicina 100, 10, 1 e 0,1 μ M, após 48 horas de tratamento, diminuíram a viabilidade celular significativamente (nível de significância de $p < 0,05$), quando comparadas ao Controle Negativo (CN), mantendo a viabilidade celular em 47,9 \pm 2,02%; 48,0 \pm 3,55%; 40,2 \pm 2,54% e 61,6 \pm 4,95% respectivamente. O ML3000, na concentração de 100 μ M, manteve a viabilidade das células em 59,43 \pm 4,95% (FIGURA 4).

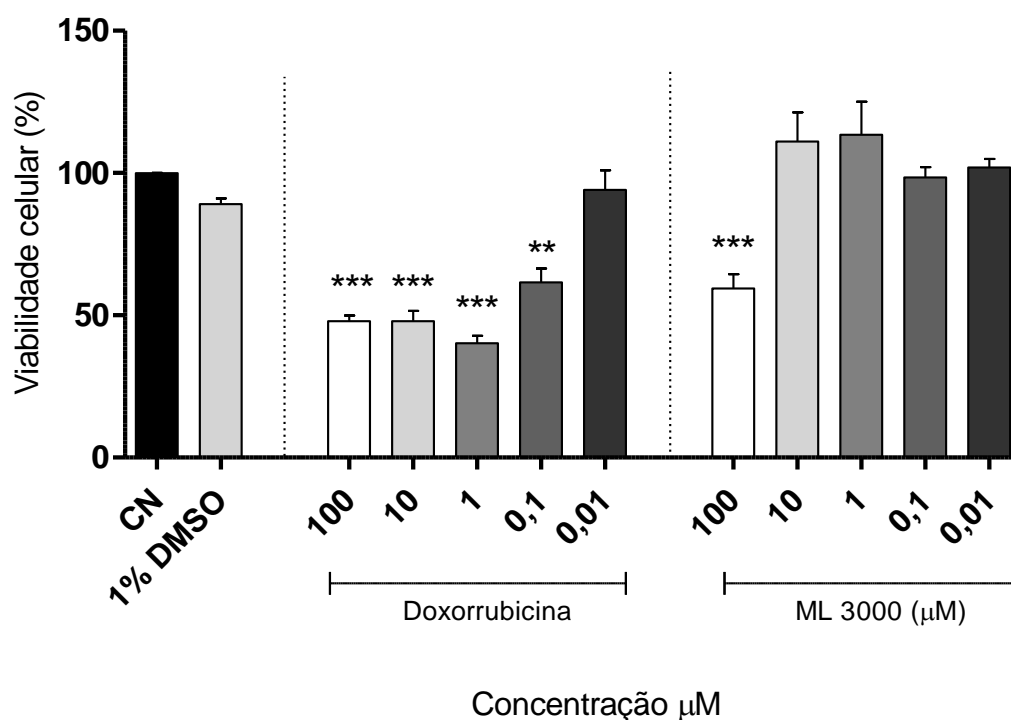


Figura 4 - Screening inicial da avaliação da viabilidade celular da linhagem LNCaP através do método de MTT após 48h de tratamento. Dados apresentados como média \pm EPM (n= 4). Análise ANOVA (Bonferroni), ***p< 0,001 em relação ao CN (controle negativo)

4.2 Análise da viabilidade celular após 48 horas de tratamento

Após o teste inicial, as concentrações das drogas utilizadas no presente trabalho foram selecionadas e novamente realizou-se testes de MTT após 48 horas de tratamento. Neste teste, as drogas em estudo foram analisadas separadamente, assim como em associação. Com este experimento, foi possível observar que a concentração de doxorubicina 1μM e a concentração de doxorubicina 1μM + ML3000 10μM diminuíram a viabilidade celular significativamente, quando comparadas ao CN, mantendo estas a $57,2 \pm 2,71\%$ e $55,5 \pm 6,87\%$, respectivamente (FIGURA 5).

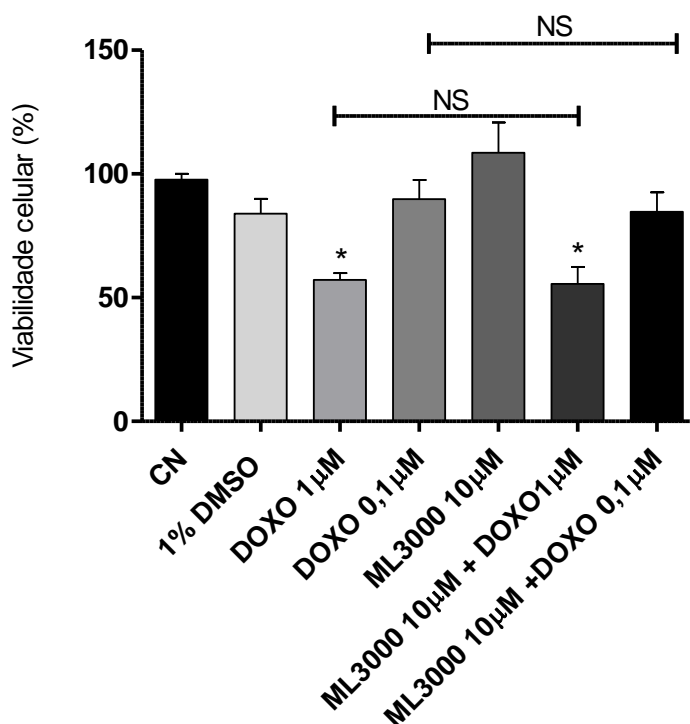


Figura 5 - Avaliação da viabilidade celular da linhagem LNCaP através do método de MTT após 48h de tratamento. Dados apresentados como média \pm EPM (n= 3). Análise ANOVA (Bonferroni), *p<0,05, em relação ao CN (controle negativo); NS: não significativo.

4.3 Investigação do efeito citotóxico de ML3000 e doxorrubicina por contagem direta com azul de Trypan após 48 horas de tratamento

As concentrações de doxorrubicina 1µM e doxorrubicina 1µM + ML3000 10µM tiveram efeito citotóxico significativo sobre as células LNCaP, mantendo a viabilidade celular em $3,5 \pm 1,19$ e $1,8 \pm 0,32\%$, respectivamente, corroborando com os resultados preliminares de viabilidade celular. Ainda, a doxorrubicina na concentração de 0,1µM e a associação doxorrubicina 0,1µM + ML3000 10µM também apresentaram efeito citotóxico, em menor proporção, quando comparadas ao CN, reduzindo a viabilidade a $44,4 \pm 5,74$ e $43,9 \pm 8,9\%$, respectivamente (FIGURA 6). A associação de ML3000 a 10µM com doxorrubicina a 1 e 0,1µM não potencializou o efeito em relação a

viabilidade e citotoxicidade celular dos compostos isoladamente, quando tratados por 48 horas.

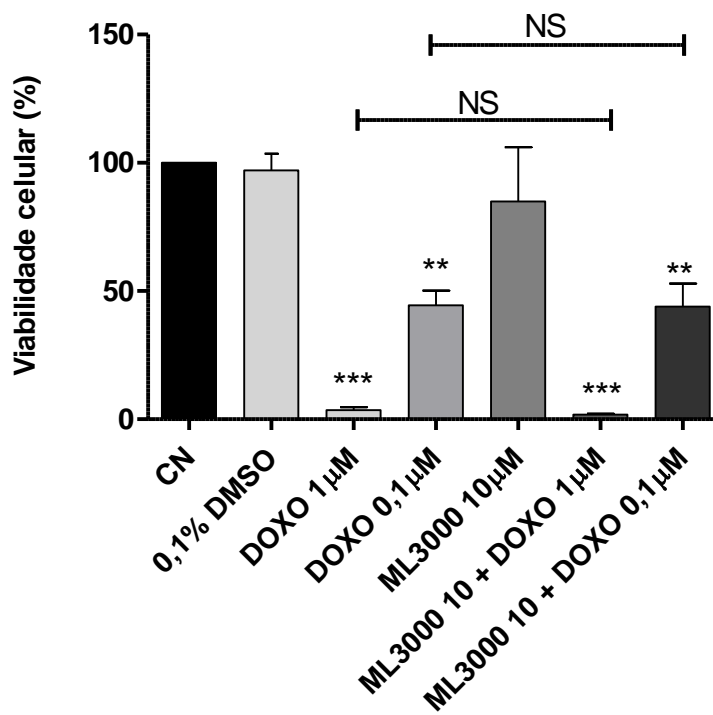
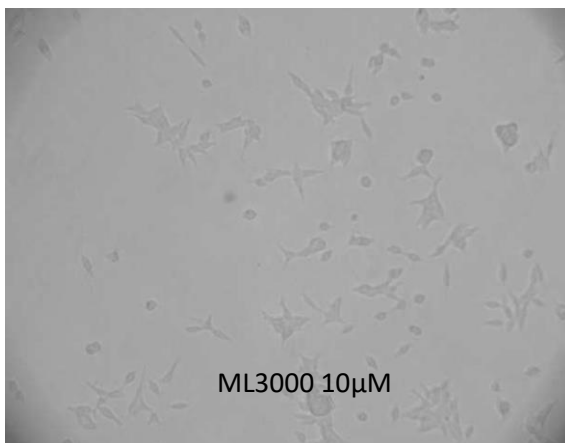
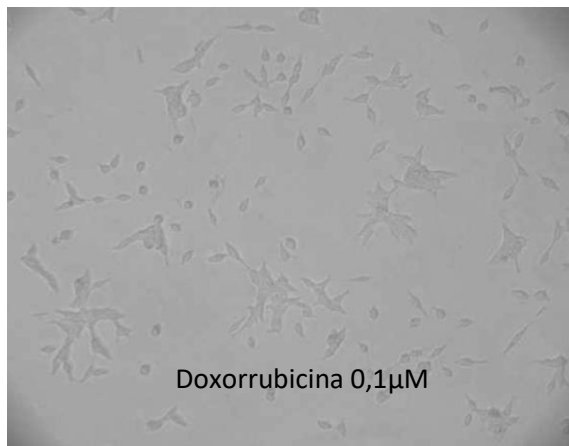
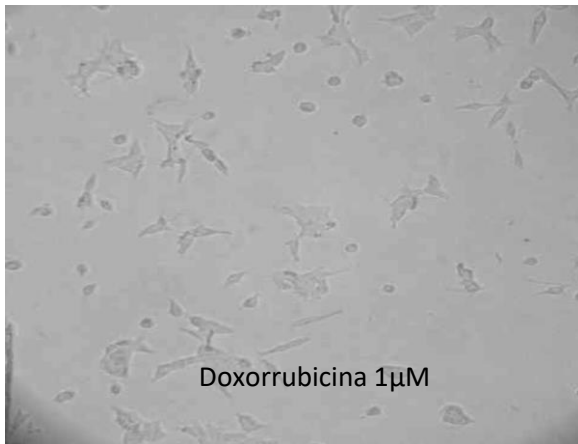
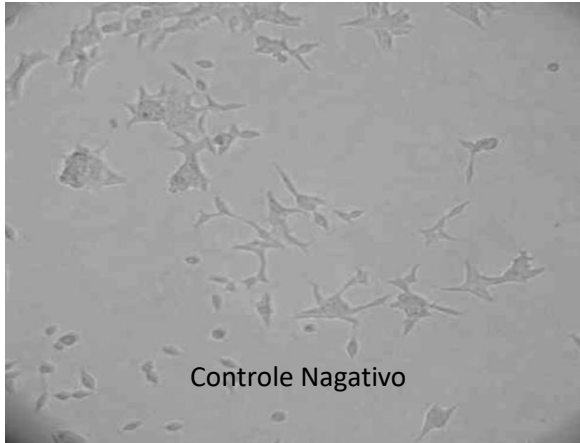


Figura 6 – Avaliação da citotoxicidade da linhagem LNCaP pelo método de exclusão de Azul de Trypan, 48h de tratamento. Dados apresentados como média \pm EPM (n= 3). Análise ANOVA (Bonferroni), **p<0,01 ***p< 0,001 em relação ao CN (controle negativo), NS: não significativo

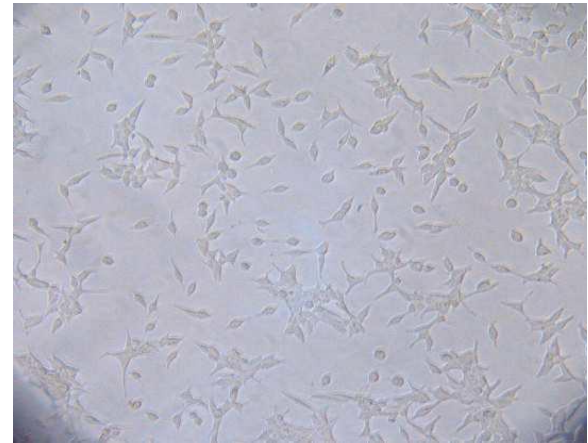
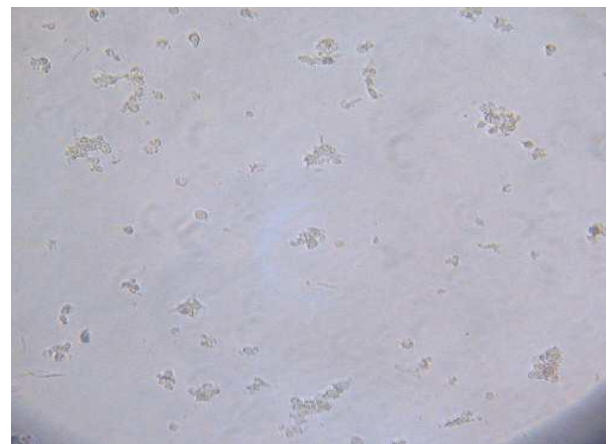
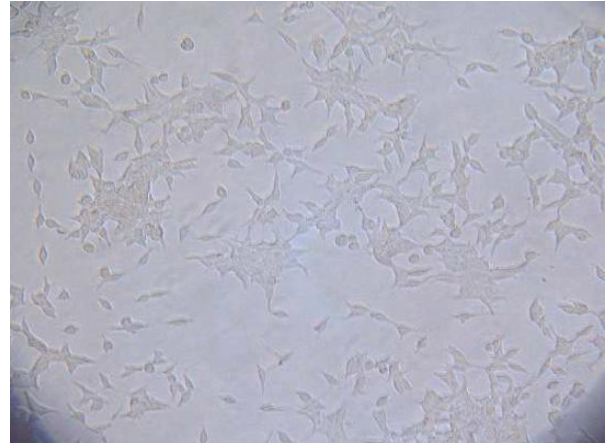
4.4 Crescimento celular

Após semeadas e tratadas, as células LNCaP foram acompanhadas após 24, 48 e 72 horas de tratamento, para que fosse possível observar o seu crescimento e sua morfologia perante o tratamento com as drogas em estudo (FIGURA 7). Passadas as 72 horas de tratamento, pôde-se observar que as células nas concentrações de doxorrubicina 1µM e doxorrubicina 1µM + ML3000 10µM mudaram significativamente a sua morfologia quando comparadas ao CN. Ainda, quando comparadas ao CN, ML3000 10µM e doxorrubicina 0,1µM, pode-se observar que houve uma diminuição da proliferação celular na concentração de doxorrubicina 0,1µM + ML3000 10µM após 72 horas de tratamento.

24 horas de tratamento



72 horas de tratamento



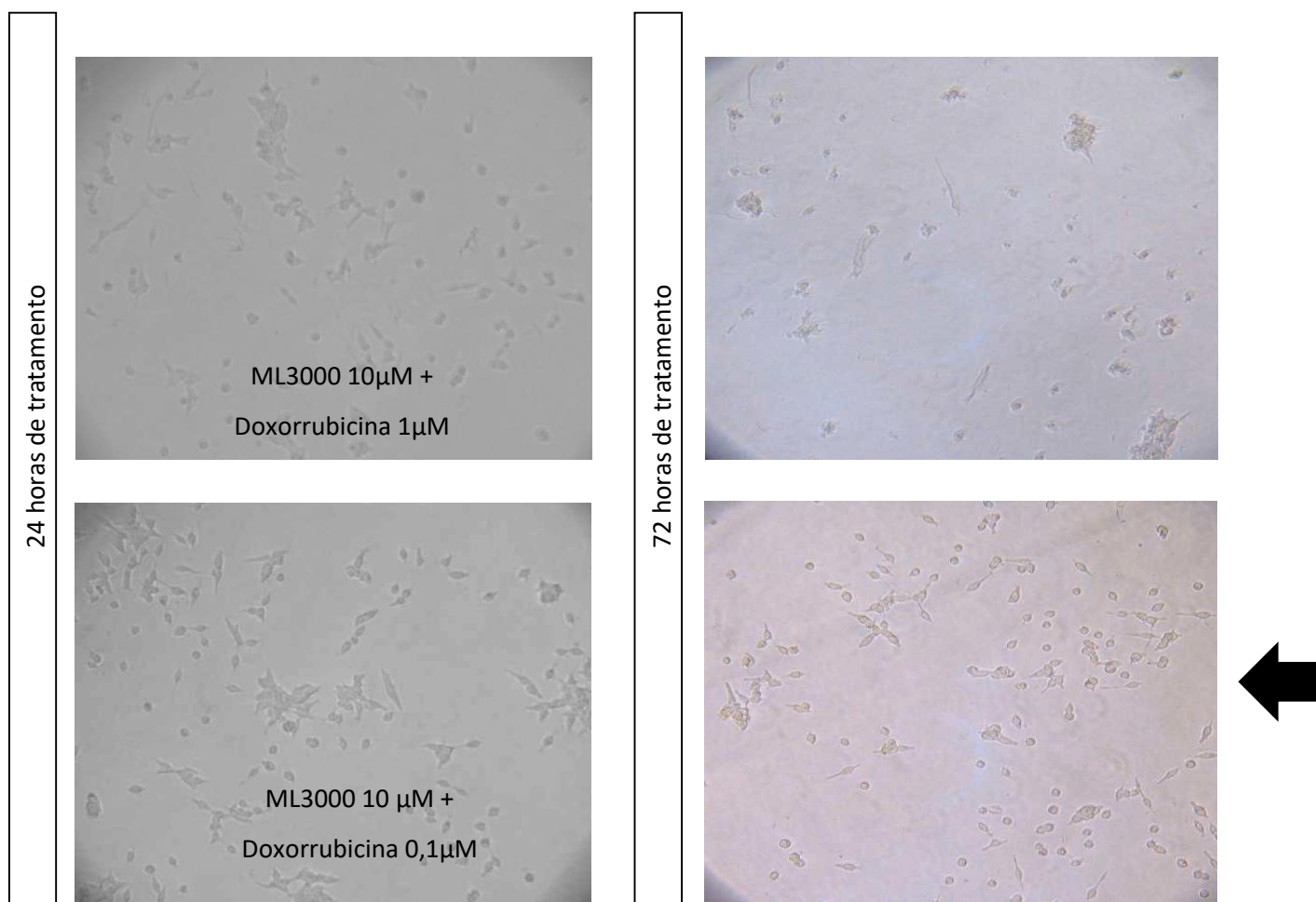


Figura 7 - Avaliação do crescimento celular da linhagem LNCaP após tratamento com os fármacos em estudo, assim como sua associação. As imagens foram capturadas após 24 e 72 horas de tratamento (imagens das páginas 42 e 43). A seta indica a diminuição da proliferação celular após 72 horas de tratamento.

A partir dos dados obtidos através do acompanhamento do crescimento celular (FIGURA 7), foram realizados experimentos subsequentes com os compostos nas concentrações doxorubicina 0,1µM, ML3000 10 µM e ML3000 10µM + doxorubicina 0,1µM após 72 horas de tratamento.

4.5 Análise da viabilidade celular após 72 horas de tratamento

As células quando submetidas ao tratamento de doxorubicina a 1µM e ML3000 10µM + doxorubicina 1µM reduziram a viabilidade celular a $29,8 \pm 2,17\%$ e $25,9 \pm 1,72\%$

respectivamente, quando comparadas ao CN. O tratamento com a doxorrubicina na concentração de 0,1 μ M e ML3000 10 μ M + doxorrubicina 0,1 μ M manteve a viabilidade celular a 50,2 \pm 1,01% e 51,0 \pm 4,43%, respectivamente (FIGURA 8).

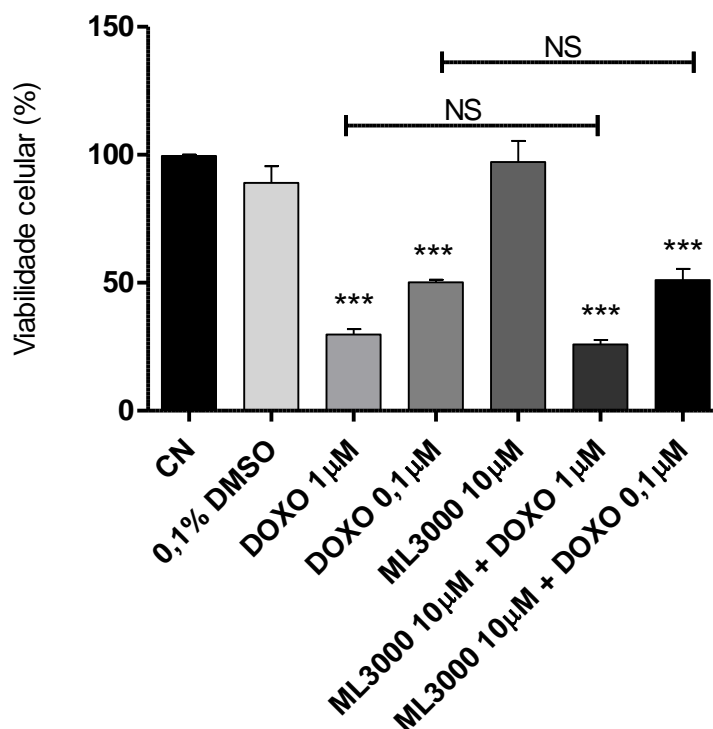


Figura 8 - Avaliação da viabilidade celular da linhagem LNCaP através do método de MTT após 72h de tratamento. Dados apresentados como média \pm EPM (n= 3). Análise ANOVA (Bonferroni), ***p< 0,001, em relação ao CN (controle negativo); NS: não significativo.

4.6 Investigação do efeito citotóxico de ML3000 e doxorrubicina por contagem direta com azul de Trypan após 72 horas de tratamento

Após 72 horas de tratamento, o número de células LNCaP viáveis decaiu quando comparadas ao tratamento de 48 horas, tanto nas concentrações de doxorrubicina 1 μ M e ML3000 10 μ M + doxorrubicina 1 μ M, 1,33 \pm 0,88% e 2,6 \pm 0,67%, respectivamente, quanto nas concentrações de doxorrubicina 0,1 μ M e ML3000 10 μ M + doxorrubicina 0,1 μ M onde a viabilidade celular mantém-se em 21,3 \pm 2,19% e 23,3 \pm 1,45% respectivamente (FIGURA 9).

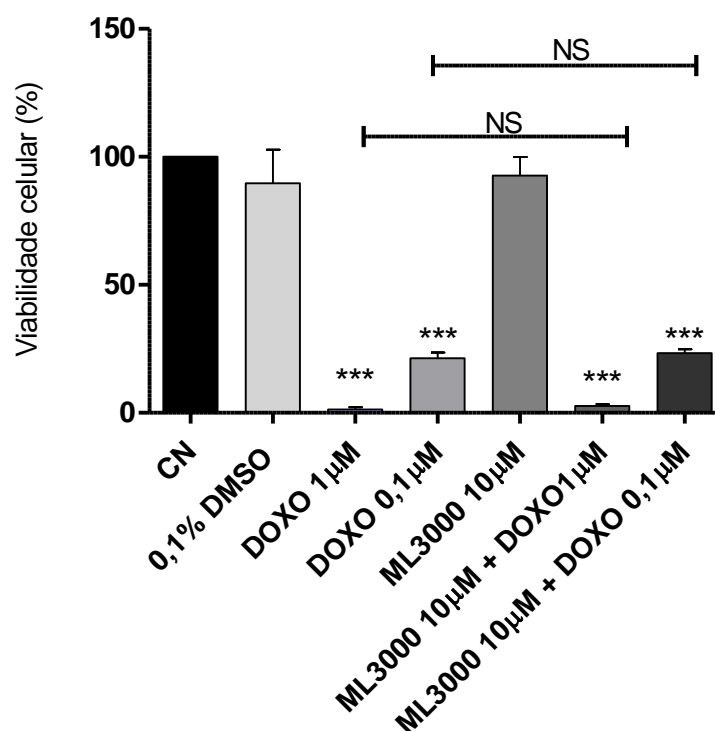


Figura 9 - Avaliação da citotoxicidade da linhagem LNCaP pelo método de exclusão de Azul de Trypan, após 72h de tratamento. Dados apresentados como média \pm EPM (n= 3). Análise ANOVA (Bonferroni), ***p< 0,001 em relação ao Controle Negativo, NS: não significativo.

Com estes dados, pôde-se fazer as comparações entre os tratamentos de 48 e 72 horas com o método de MTT, assim como a comparação com o método de contagem direta com azul de Trypan.

Os dados demonstram que a viabilidade celular diminui quando as células são submetidas ao tratamento com doxorrubicina por 72 horas, porém sua associação nas concentrações de 1 e 0,1µM com ML3000 10µM não é potencializada. Foi possível observar que a citotoxicidade das drogas foi potencializada das concentrações de doxorrubicina 0,1µM, assim como quando associada ao ML3000 0,1µM em 72 horas.

Através destes ensaios, e visto que as concentrações de doxorubicina 1 μ M e ML3000 10 μ M + doxorubicina 1 μ M diminuíram significativamente a viabilidade e morfologia das células LNCaP, os testes de migração celular e a expressão proteica foram realizados com doxorubicina 0,1 μ M; ML3000 10 μ M e ML3000 10 μ M + doxorubicina 1 μ M após 72 horas de tratamento.

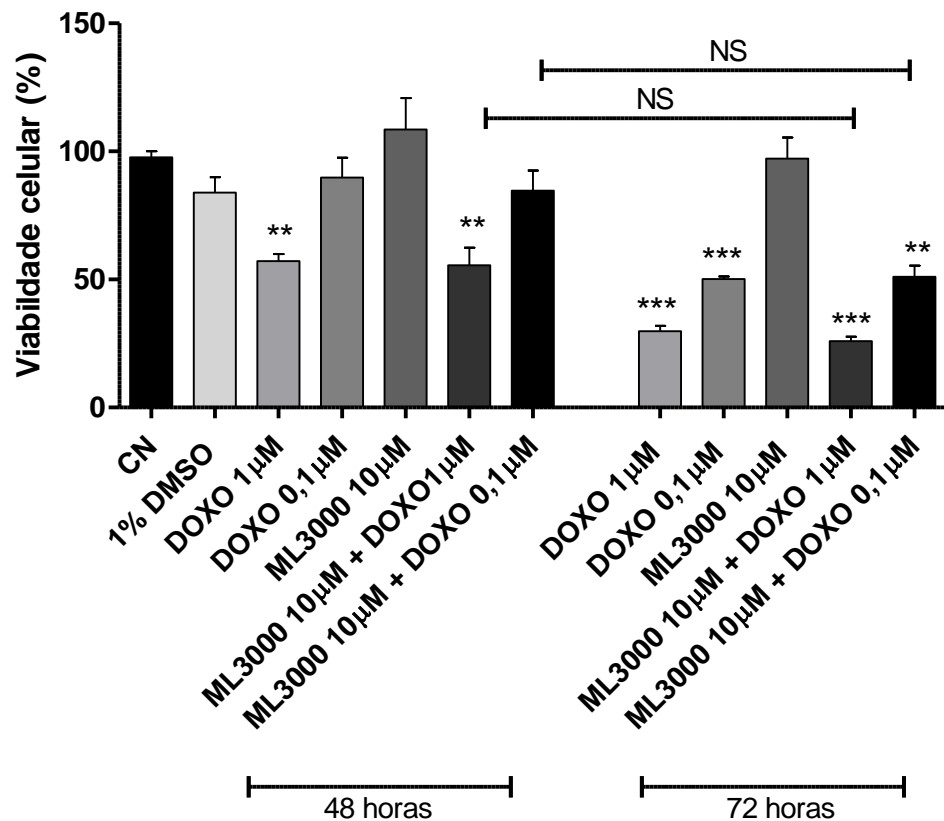


Figura 10 - Avaliação da viabilidade celular da linhagem LNCaP através do método de MTT. Comparação entre os tratamentos de 48 e 72 horas (n= 3). Dados apresentados como média \pm EPM. Análise ANOVA (Bonferroni), **P<0,01 ***p< 0,001 em relação ao Controle Negativo. NS: não significativo.

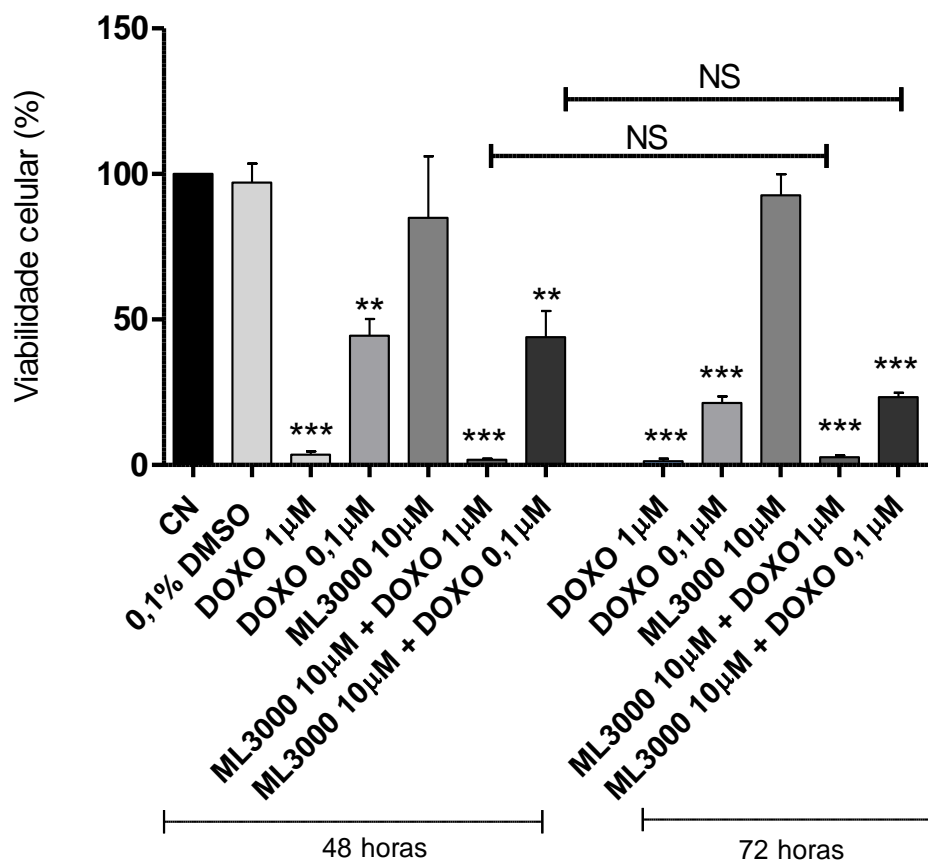


Figura 11 - Avaliação da citotoxicidade da linhagem LNCaP pelo método de exclusão de Azul de Trypan. Comparação entre os tratamentos de 48 e 72 horas (n= 3). Dados apresentados como média \pm EPM. Análise ANOVA (Bonferroni), ** $P < 0,01$ *** $p < 0,001$ em relação ao Controle Negativo. NS: não significativo.

Mesmo não havendo uma diferença significativa entre os gráficos comparando os tratamentos de 48 e 72 horas de tratamento (FIGURAS 10 e 11), é possível visualizar que ocorre uma diminuição da viabilidade celular com 72 horas de tratamento. A diminuição da viabilidade celular na concentração de doxorubicina 1µM e 0,1µM decai 27,4 e 39,7%, respectivamente. Quando o ML3000 10µM é associado a doxorubicina 1µM e 0,1µM, a viabilidade celular decai 29,6 e 33,6%, respectivamente. Assim como no teste da avaliação da citotoxicidade com azul de Trypan, onde é possível observar que a viabilidade celular também decai em 72 horas de tratamento. A diminuição da viabilidade celular na concentração de doxorubicina 1µM e 0,1µM decai 2,2 e 23,3%, respectivamente. Quando o ML3000 10µM é associado a doxorubicina 1µM não houve diminuição da viabilidade celular significativa, devido ao baixo número de células viáveis encontradas. Ainda, quando o ML3000 10 µM é associado a doxorubicina 0,1µM, a viabilidade celular decai 20,6%.

4.7 Análise da migração celular

Pode-se observar (FIGURA 12) que a associação de ML3000 10 μ M + doxorubicina 0,1 μ M não interferiu significativamente na capacidade migratória das células após 72 horas, quando comparada ao tratamento unicamente com doxorubicina 0,1 μ M.

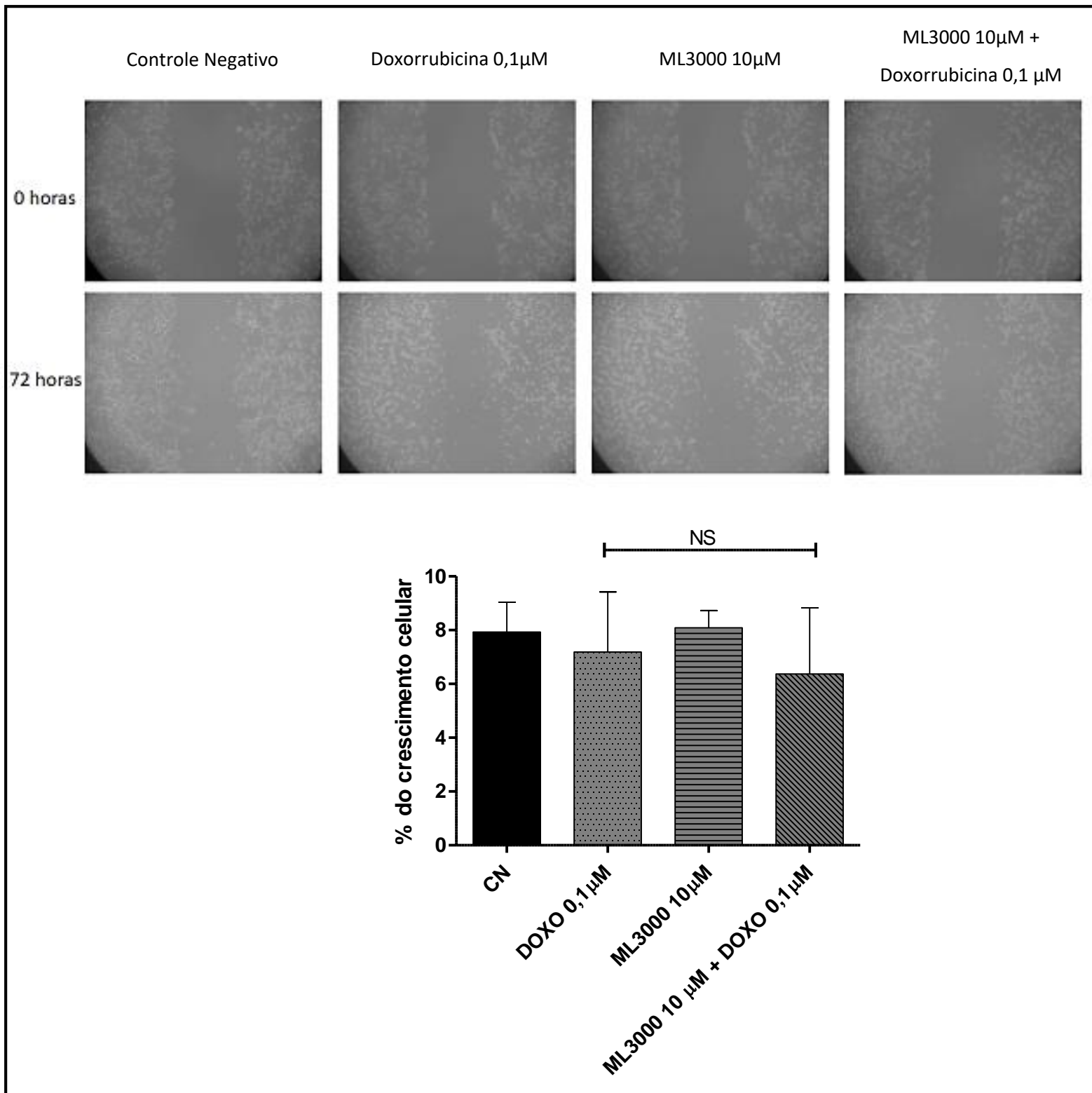


Figura 12 - Avaliação da capacidade de migração da linhagem LNCaP após 72 horas de tratamento (n= 3). Dados apresentados como média \pm EPM. Análise ANOVA (Bonferroni), NS: não significativo.

4.8 Análise da expressão de p38- α

A expressão de p38- α encontra-se diminuída nas concentrações de doxorrubicina 0,1 μ M, assim como na associação de ML3000 10 μ M + doxorrubicina 0,1 μ M, 0,35 \pm 0,009% e 0,40 \pm 0,005% em relação ao CN (FIGURA 11), porém sem diferença estatística quando comparada entre os tratamentos. O tratamento com ML3000 não interferiu a expressão da proteína p38- α (FIGURA 13).

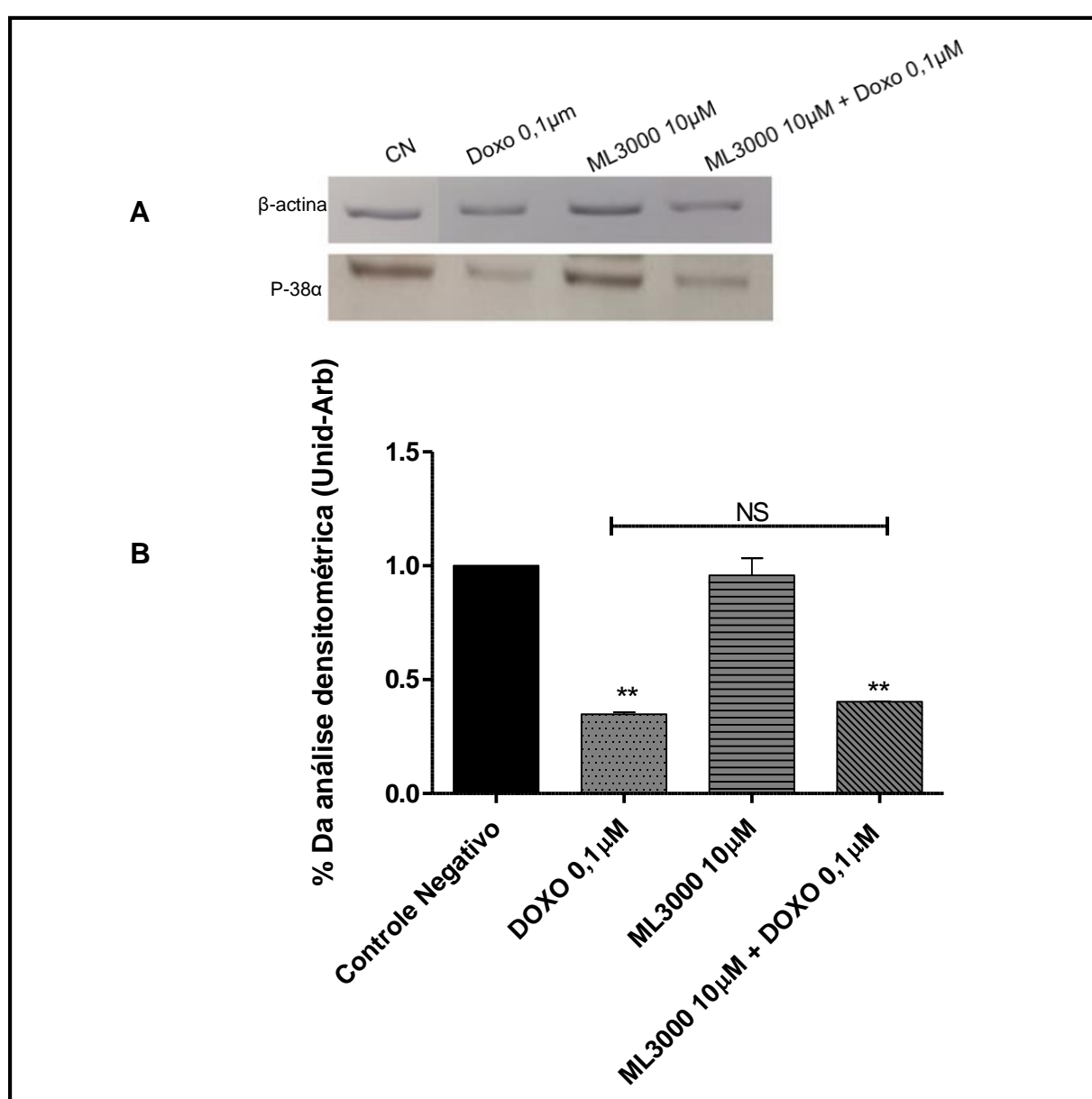


Figura 13 - Avaliação da expressão proteica de p-38 α na linhagem LNCaP após 72 horas de tratamento. A densidade dos *plots* foi calculada em relação ao *plot* do controle negativo (CN). β -actina foi utilizada como controle interno (**A**): *immunoblotting* das proteínas avaliadas após tratamento com os fármacos

em estudo. **(B)**: resultados da porcentagem (%) da densidade dos fármacos de p-38 α . Dados apresentados como média \pm EPM. Análise ANOVA (Bonferroni), **P<0,01 em relação ao Controle Negativo, NS: não significativo. (n=2).

4.9 Análise da expressão de Caspase-3

Assim como na análise da expressão proteica de p38- α , para este experimento, foram utilizadas as amostras de CN, doxorrubicina 0,1 μ M, ML3000 10 μ M e ML3000 10 μ M + doxorrubicina 0,1 μ M. Pode-se observar que a expressão de Caspase-3 encontra-se diminuída significativamente nas concentrações de doxorrubicina 0,1 μ M, assim como na associação de ML3000 10 μ M + doxorrubicina 0,1 μ M, 0,39 \pm 0,01% e 0,28 \pm 0,03%, respectivamente, quando comparado ao CN (FIGURA 14).

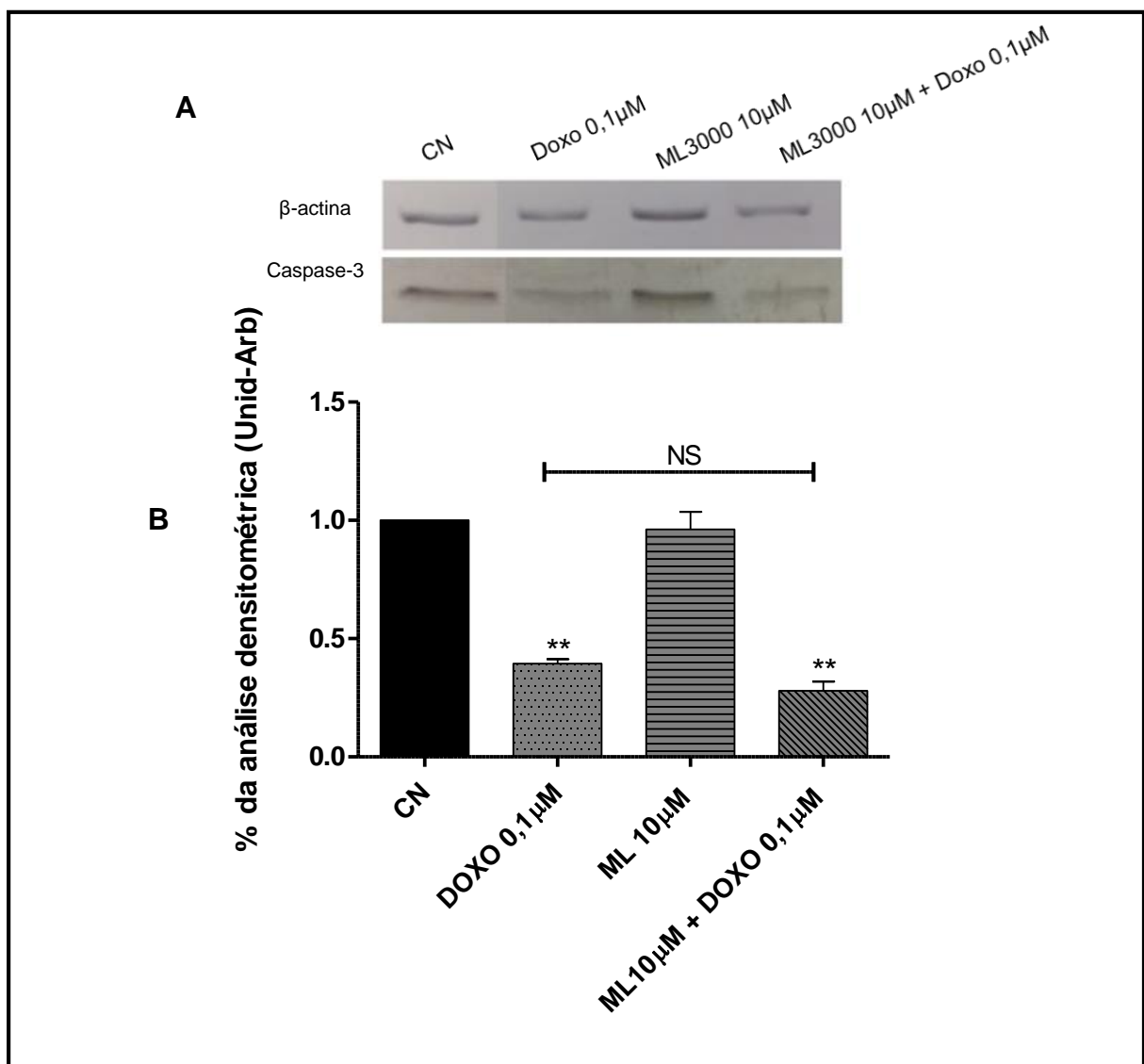


Figura 14 - Avaliação da expressão proteica de caspase-3 na linhagem LNCaP após 72 horas de tratamento. A densidade dos *plots* foi calculada em relação ao *plot* do controle negativo CN. β -actina foi utilizada como controle interno **(A)**: imunoblotting das proteínas avaliadas após tratamento com os fármacos em estudo. **(B)**: resultados da porcentagem (%) da densidade dos fármacos de p-38 α . Dados apresentados como média \pm EPM. Análise ANOVA (Bonferroni), ** $P < 0,01$ em relação ao Controle Negativo, NS: não significativo. (n=2).

4.10 Análise da viabilidade celular após 24 horas de tratamento das células RAW 264.7

As drogas em estudo também foram testadas em macrófagos murinos RAW 264.7. Os tratamentos utilizados foram: CN (controle negativo); doxorrubicina 0,1 μ M; ML3000 10 μ M e ML3000 10 μ M + doxorrubicina 0,1 μ M. Pôde-se observar que a viabilidade celular não foi diminuída quando o ML3000 10 μ M foi associado à doxorrubicina 0,1 μ M, porém não apresentou diferença significativa (FIGURA 16).

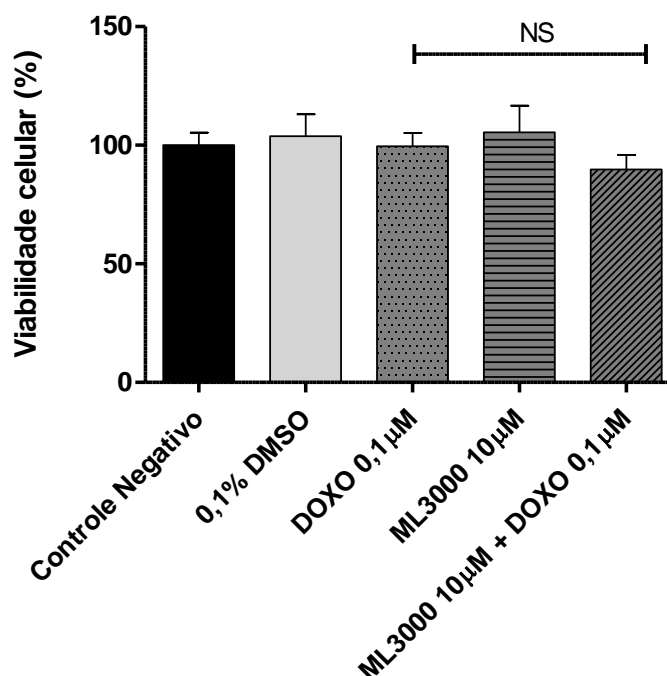


Figura 15 - Avaliação da viabilidade celular da linhagem RAW 264.7 através do método MTT, 24h de tratamento. Dados apresentados como média \pm SEM (n = 3). NS: não significativo.

4.11 Avaliação da inibição de TNF- α em células RAW 264.7

Este teste foi realizado a fim de avaliar a inibição de TNF- α em células RAW264.7. As concentrações das drogas testadas foram as seguintes: controle negativo (apenas meio DMEN); controle positivo (meio DMEN + LPS) doxorrubicina 0,1 μ M; ML3000 10 μ M e ML3000 10 μ M + doxorrubicina 0,1 μ M. Após o tratamento, as células foram incubadas por 1 hora. Passado este período, as células foram estimuladas com LPS (exceto controle negativo). Pode-se observar que os tratamentos utilizados nas células RAW264.7 não tiveram a capacidade de inibir a produção de TNF- α (FIGURA 17).

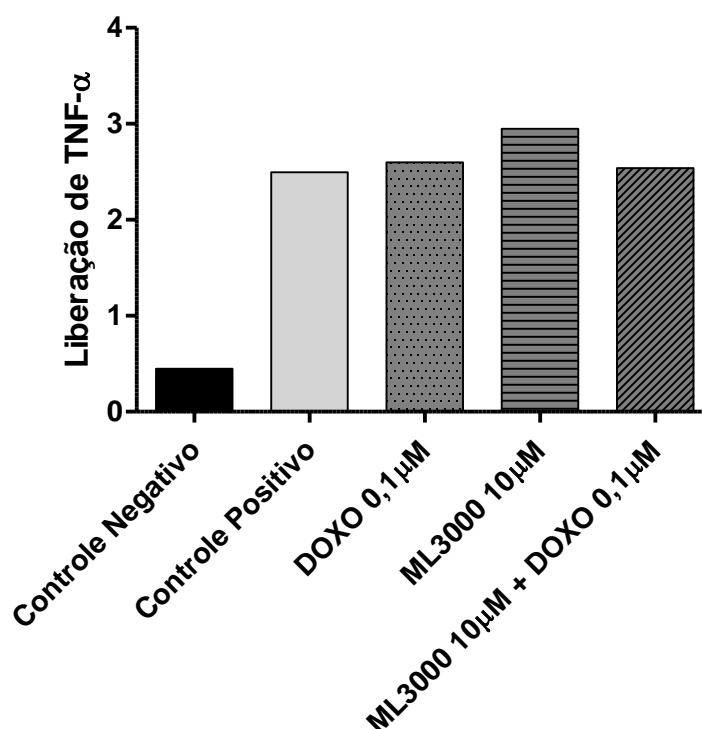


Figura 16 – Avaliação da capacidade de inibição de TNF- α da linhagem RAW 264.7 após 24h de tratamento. (n = 1).

5. DISCUSSÃO

Estudos vêm relatando que a inflamação crônica pode estar diretamente relacionada com o desenvolvimento e a progressão do CaP, por propiciar um microambiente inflamatório favorável para tal. Sendo assim, diversos estudos fazem-se necessários para que o correto tratamento seja administrado em pacientes acometidos pelo CaP. Neste contexto, uma estratégia que vem se mostrando promissora é a utilização de quimioterápicos associado a anti-inflamatórios. Sendo assim, a presente pesquisa investigou o tratamento de células de adenocarcinoma de próstata com doxorrubicina, ML3000 e a associação destes fármacos. Ainda, o efeito anti-inflamatório foi investigado em macrófagos murinos RAW 264.7.

O mesmo ensaio foi realizado com a droga ML3000, utilizando-se as concentrações de 100, 10 e 1 μ M. Apenas a concentração de 100 μ M mostrou-se capaz de diminuir a viabilidade das células LNCaP. A concentração selecionada para os posteriores ensaios foi de 10 μ M, a qual não apresentou efeito sobre a proliferação das células quando tratadas com o ML3000.

Sabe-se que a doxorrubicina é um fármaco quimioterápico utilizado para o tratamento de diversos tipos de câncer, incluindo tumores hematológicos e sólidos. Sua atividade terapêutica consiste principalmente na inibição da topoisomerase II, inibindo a síntese de DNA (GUMULEC et al., 2014), o que pode explicar a mudança

na morfologia e redução na proliferação das células LNCaP após os tratamentos, como observado neste estudo. Ainda, a doxorrubicina é um fármaco da classe das antraciclinas que foi considerado altamente eficaz para o tratamento do câncer de próstata, no entanto, seu uso tem sido limitado, o que é atribuído a sua alta toxicidade e efeitos secundários, incluindo mielossupressão, sintomas gastrointestinais, cardiotoxicidade e quimiorresistência em pacientes com CaP (CHEN et al., 2017).

A combinação de drogas é realizada atualmente na prática clínica para melhorar os efeitos das drogas utilizadas, assim como para tentar diminuir os efeitos tóxicos das mesmas. Em um estudo de Abushouk et al. (2017), os autores apontam os fitoquímicos como promissores agentes terapêuticos para a cardiotoxicidade induzida por doxorrubicina. Citam ainda que os mecanismos responsáveis por estes efeitos cardioprotetores incluem antioxidantes, antiapoptóticos e anti-inflamatórios, no entanto, as evidências estão limitadas a ensaios pré-clínicos, ressaltando a importância da combinação de drogas para o tratamento. Em um recente trabalho de CHEN et al. (2017) os autores mostram que a associação de custonolide e doxorrubicina induz a apoptose de células de câncer de próstata via a ativação de p-38 α . Ainda, como exposto anteriormente, o ML3000 por ser um duplo inibidor de COX 1/2 e 5-LOX, que aumenta a segurança gastrointestinal, pode ser um coadjuvante no tratamento. Com isso, seria possível a redução da quantidade de quimioterápico, essa redução, além de fornecer maior segurança gastrointestinal, poderia diminuir a toxicidade do quimioterápico.

Pôde-se observar nos testes de MTT realizados que a viabilidade celular diminuiu significativamente com as concentrações de doxorrubicina 1 μ M, assim como em associação com o ML3000 10 μ M, tanto nos experimentos com 48 horas de tratamento, quanto nos experimentos em que o tratamento foi de 72 horas. Porém, é possível observar que a viabilidade celular teve diminuição mais significativa após 72 horas de tratamento, em relação ao controle negativo. Em um estudo de Azimian-Zavareh, Hossein e Janzamin (2012) em células LNCaP, a doxorrubicina foi avaliada em diferentes concentrações, assim como em associação. Pôde-se observar que a droga não alterou a viabilidade das células LNCaP após 24 horas de tratamento, porém mostrou um efeito citotóxico após 48 e 72 horas nas doses de 250 e 500 nM,

corroborando com os dados obtidos no presente estudo em que a viabilidade celular é tempo e dose dependente.

O principal princípio do ensaio MTT é a redução dos sais de tetrazólio para o formazana pela succinato desidrogenase (SDH), localizada na membrana mitocondrial. No entanto, a SDH só está ativa em células com metabolismo e cadeia respiratória intactos. O estresse oxidativo, presente pelo tratamento com antraciclina, está associado a uma diminuição significativa da atividade de SDH (RAI et al., 2018).

Portanto, a redução da viabilidade celular ilustrada do ensaio MTT pode ser causada por baixa atividade metabólica das células, causada pela autofagia ou senescência, que podem estar relacionadas a dose de doxorrubicina utilizada nos tratamentos do presente estudo.

Com os testes de contagem direta de azul de Trypan, também pôde-se observar uma redução significativa na viabilidade celular de LNCaP, corroborando com os dados obtidos através dos testes de MTT, porém com valores que diferem entre si. Neste experimento, foi possível avaliar que, assim como no teste de MTT, a viabilidade celular também é dose e tempo dependente.

Ainda, segundo Rai et al. (2018), o ensaio de MTT pode ser utilizado para estimar o potencial metabólico das células, pois os resultados obtidos a partir deste ensaio representam o metabolismo da célula e não o número de células presentes nos testes. Neste contexto, vale observar que o teste de contagem direta com azul de Trypan baseia-se no número de células que não estão coradas com este reagente, podendo explicar a diferença de valores entre os testes de MTT e contagem direta com azul de Trypan.

Tendo em vista a importância da supressão da migração celular para retardar a progressão tumoral, avaliou-se o potencial da associação das drogas em estudo frente à migração celular *in vitro*. A capacidade de migração das células cancerosas permite seu deslocamento através dos tecidos. Através desse processo, as células neoplásicas invadem os vasos sanguíneos e se disseminam na circulação, desenvolvendo metástases e, assim, alcançando órgãos distantes (MICHAELIS, 2014). Diante disso, avaliou-se o potencial da associação das drogas em estudo frente

à migração celular *in vitro*. No teste de avaliação da capacidade de migração celular, pôde-se verificar que a associação de ML3000 10 μ M + doxorrubicina 0,1 μ M foi responsável por uma leve diminuição na migração das células LNCaP, porém sem significância. Em um estudo de Yu et al. (2017) os autores avaliaram a capacidade de migração das células LNCaP transfectadas com ER β e puderam avaliar que a capacidade de migração das células é diminuída quando este receptor está ativo. Ainda, quando há expressão deste receptor, há uma diminuição na expressão de p-38 α e consequente diminuição na proliferação celular. Neste experimento, as células foram avaliadas após 24 horas da realização do risco.

Vários mecanismos, incluindo a ação sobre a topoisomerase II e o estresse oxidativo, foram propostos para explicar a morte celular mediada por doxorrubicina. Assim como a doxorrubicina, outras antraciclinas também se intercalam diretamente com o DNA, levando ao estresse torsional e à desestabilização dos nucleossomos. Consequentemente, o principal efeito da doxorrubicina e de outras antraciclinas é desencadear uma resposta ao dano do DNA e subsequentemente ativar uma via apoptótica para matar células proliferativas, como células cancerosas (YANG et al., 2016).

O microambiente inflamatório está presente nos tumores e é caracterizado pela presença de leucócitos do hospedeiro, tanto nos tumores como no estroma, sendo que alguns linfócitos podem contribuir para o avanço do câncer e sua disseminação (ALLEN et al. 2015).

Ainda, um dos principais fatores inflamatórios intimamente ligados à carcinogênese é a ativação de PGE₂, um eicosanóide fisiologicamente abundante, derivado do ácido araquidônico através da cicloxigenase COX1/2. A PGE₂ sinergiza com leucotrieno B₄ para induzir a inflamação local e para atrair células imunes para o tecido. Os leucotrienos também são produzidos a partir do ácido araquidônico, mas requerem a enzima 5-lipoxigenase (5-LOX) para a produção de mediadores inflamatórios (NEUMANN et al., 2016).

A atividade do ML3000 é em grande parte atribuída à redução da produção de leucotrienos, especialmente leucotrieno-B₄, bloqueando a via de sinalização 5-LOX. Inibindo a via 5-LOX, uma das principais vias metabólicas do ácido

araquidônico, há redução subsequente de leucotrienos pró-inflamatórios (SHARMA et al., 2011), diminuindo o microambiente inflamatório, que segundo Hanahan e Weinberg (2012) é essencial para o desenvolvimento tumoral.

No presente trabalho, a expressão proteica de COX-2 foi avaliada com o método de Western Blotting, porém não foi possível a visualização das bandas, necessitando de ajustes na metodologia.

Também, em um estudo de Tavolari et al. (2008), foi demonstrado que o ML3000 possui um efeito anti-proliferativo na linha celular de câncer de cólon humano HCA-7, diminuindo a viabilidade celular desta linhagem, de maneira tempo e dose dependente. Neste estudo, os autores utilizaram as concentrações de 100; 125 e 150µM, com 24 e 48 horas de tratamento. Novamente, a viabilidade celular teve diminuição mais significativa em 48 horas de tratamento. Ainda, a diminuição da viabilidade celular foi associada à indução da apoptose, como demonstrado pelo fato de que, quando expostos ao ML3000, as células HCA-7 exibiam as características típicas da morte apoptótica, com a presença de núcleos picnóticos.

A respeito do tratamento de ML3000 em diversas linhagens celulares, Liu et al. (2011) mostrou que o ML3000 e seus derivados reduziram a expressão de COX 1/2 e o crescimento de células de câncer de mama. Os autores compararam esses efeitos com agentes antitumorais estabelecidos, como a cisplatina. Mohammed et al (2011) mostraram que a administração de licofelone resultou na diminuição da expressão de COX-2 e 5-LOX em pólipos intestinais, quando comparados ao controle. Já Narayanan et al. (2007) demonstraram que células de carcinoma da próstata expressaram alta taxas de COX-2 e 5-LOX. Em seu estudo, as células cancerosas foram tratadas com ML3000 em várias doses e tempos diferentes, onde as células tratadas com ML3000 apresentaram *downregulation* de expressão de genes e inibição da síntese de COX-2 e 5-LOX. Concluindo que, como resultado dessa inibição, o ML3000 impediu o crescimento celular e induziu a apoptose destas células. Neste estudo, as células utilizadas foram de adenocarcinoma de próstata PC3. Kabadere et al. (2014) trazem que um inibidor duplo do metabolismo do ácido araquidônico, como ML3000, pode ser usado para impedir a sobrevivência das células cancerígenas. De acordo com seus resultados, o ML3000 induziu a apoptose precoce, em tempo e dose

dependente. Neste estudo, o ML3000 teve a maior capacidade induzir a apoptose precoce e apoptose tardia, assim como necrose. Ainda, este fármaco aumentou o nível do componente-chave do processo apoptótico, ou seja, a caspase-3.

Ainda, a ação do ML3000 sobre essas células tumorais pode estar relacionada com a inibição simultânea de COX-1/2 e 5-LOX, que reduz a produção de prostaglandinas e leucotrienos, fazendo com que diminua a inflamação. Quando a via das COX-1/2 é inibida, há uma consequente diminuição da produção de prostaglandinas, porém o metabolismo do ácido araquidônico aumenta por meio da via de 5-LOX, fazendo com que ocorra um aumento na produção de leucotrienos, componentes dos processos inflamatórios e possivelmente dos danos gástricos (MANJANNA e SHIVAKUMAR, 2011).

Neste estudo também foi possível observar que a doxorrubicina 0,1 μ M, assim como a associação de ML3000 10 μ M + doxorrubicina 0,1 μ M foram capazes de reduzir significativamente a expressão de p38- α e Caspase-3, quando comparadas ao controle negativo.

Embora os mecanismos completos envolvidos no desenvolvimento e progressão do CaP ainda não sejam totalmente compreendidos, alguns deles incluem as MAPK's. Em particular, a MAPK p38- α mostrou-se envolvida em células de câncer de próstata, onde controla diversas funções celulares, incluindo a apoptose, embora seu papel exato nesta doença pareça ser complexo (GIL-ARAUJO et al., 2014). A respeito da apoptose, as caspases pertencem à família das cisteínas proteases, que conseguem reconhecer e clivar substratos que possuam resíduos de aspartato. Assim, sinalizam para a apoptose e clivam esses substratos, levando à condensação e fragmentação nuclear, expondo fosfolipídios de membrana que irão sinalizar para que estas células sejam fagocitadas por macrófagos (BOATRIGT; SALVESEN, 2003)

Os macrófagos estimulados com LPS têm sido vastamente utilizados em estudos de respostas inflamatórias (PARK et al., 2012). O LPS ativa macrófagos por meio da estimulação de vias de sinalização, aumentando a produção de mediadores inflamatórios. Esses mediadores desempenham um papel importante na iniciação e

na amplificação da resposta inflamatória, sendo excelentes biomarcadores do processo de inflamação (WANG et al., 2012).

No teste de avaliação da liberação de TNF- α foram utilizadas concentrações dos fármacos em estudo que não interferissem na viabilidade dos macrófagos RAW 264.7. Em todas as concentrações avaliadas os fármacos não apresentaram potencial anti-inflamatório após 24 horas de tratamento, quando comparadas ao controle positivo, ou seja, não inibiram a liberação de TNF- α .

A expressão de TNF- α leva à ativação de cascatas de MAPK, incluindo as vias de sinalização ERK1 / 2, p38, c-Jun N-terminal quinase (JNK). Foi relatado que o TNF- α induz a apoptose na linhagem celular LNCaP. Ainda, estudos anteriores demonstraram que o TNF- α pode aumentar a concentração dos níveis de mRNA e proteína KLF5, o que resulta em apoptose celular via ativação da via de sinalização de JNK no câncer de esôfago (SHI et al.; 2017)

6. CONCLUSÃO

A inflamação tem se mostrado como um componente essencial para o desenvolvimento e progressão tumoral. Diante disso, faz-se necessária a utilização de fármacos capazes de interferir na progressão tumoral, assim como agir sobre a inflamação, ainda, garantir a diminuição de efeitos colaterais, seja de toxicidade ou gastrointestinais. Neste estudo, foi possível observar que a utilização de doxorrubicina, assim como sua associação com ML3000, foi capaz de reduzir a expressão de p38- α nas células LNCaP. Estudos prévios mostram que esta via está ativada nestas células e sua inibição tem demonstrado atividade antitumoral. Também, a ação destes fármacos reduziu significativamente a viabilidade celular em células LNCaP e esta redução está ligada a dose e ao tempo de tratamento.

É importante ressaltar que em estudos anteriores, foi demonstrado que o ML3000 induz a apoptose em diferentes linhagens celulares. Sendo assim, a ação da doxorrubicina poderia ser potencializada em associação ao ML3000, o que poderia levar a uma diminuição na dose de quimioterápico utilizado no tratamento.

Ainda, análises complementares de p38- α , pp38 e COX-2 serão realizadas para elucidar parcialmente o mecanismo envolvido na diminuição da proliferação celular observada nos experimentos. Também, demais testes podem ser realizados, tanto na linhagem LNCaP como na linhagem RAW 264.7, com diferentes doses dos fármacos e tempos de tratamento.

Por fim, esta pesquisa apresentou algumas limitações no decorrer do tempo quanto aos experimentos realizados. Alterações na morfologia e crescimento das linhagens celulares utilizadas neste trabalho, consequentemente exigiram maior demanda e número de experimentos. Devido alguns problemas quanto a padronização da utilização de alguns anticorpos como COX-2, pp38- α e BCL-2, os experimentos de avaliação da expressão destas proteínas não foram utilizados nos resultados pois a marcação não foi eficiente. Experimentos prévios de avaliação de morte celular com a utilização de anexina e 7-AAD também foram realizados, porém, serão repetidos para confirmação de resultados.

REFERÊNCIAS

ABUSHOUK, A. I. et al. Cardioprotective mechanisms of phytochemicals against doxorubicin-induced cardiotoxicity. **Biomedicine & Pharmacotherapy**. v. 90, p. 935-946, 2017.

ALLEN, M. D.; JONES, L. J. "The role of inflammation in progression of breast cancer: Friend or foe? (Review)." **International Journal of Oncology**, v. 47, p. 797-805. 2015.

ALMEIDA, V. L. et al. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. **Química Nova**, vol. 28, n. 1, p. 118-129, 2005.

AMERICAN CANCER SOCIETY. **Treating prostate cancer**. Disponível em: <https://www.cancer.org/cancer/prostate-cancer/treating.html>., 2018 (Acesso em: 10 jan. 2018).

AZIMIAN-ZAVAREH, V.; HOSSEIN, G.; JANZAMIN, E. Effect of lithium chloride and antineoplastic drugs on survival and cell cycle of androgen-dependent prostate cancer LNCaP cells. **Indian Journal of Pharmacology**. v. 44, n. 6, p. 714-721, 2012.

BARBOSA, M. L. C. et al. Therapeutic approaches for tumor necrosis factor inhibition. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 47, p. 427-446, 2011.

BERTHOLD, D. R. et al. Docetaxel plus prednisone or mitoxantrone plus prednisone for advanced prostate cancer: Updated survival in the TAX 327 study. **Journal of Clinical Oncology**, v. 26, p. 242-245, 2008.

BOATRIGHT, K. M.; SALVESEN, G. S. Mechanism of caspase activation. **Current Opinion in Cell Biology**. v. 15, p. 725-731, 2003.

BRAVO-CORDERO J. J, HODGSON J. J. L e CONDEELIS J. Directed cell invasion and migration during metastasis. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 24, p. 277–283, 2012.

BROWNE, A. J. et al. p38 MAPK regulates the Wnt inhibitor Dickkopf-1 in osteotropic prostate cancer cells. **Cell Death and Disease**, v. 7, p. 1-11, 2016.

CHEN, J. et al. Costunolide enhances doxorubicin-induced apoptosis in prostate cancer cells via activated mitogen-activated protein kinases and generation of reactive oxygen species. **Oncotarget**. v. 8, n. 64, p. 107701-107715, 2017.

CLIMENT, M. A. et al. Weekly cabazitaxel plus prednisone is effective and less toxic for ‘unfit’ metastatic castration-resistant prostate cancer: phase II spanish oncology genitourinary group (SOGUG) trial., **European Journal of Cancer**, v. 87, p. 30-37, 2017.

DANIYAL, M. et al. Epidemiology, etiology, diagnosis and treatment of prostate cancer. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**. v. 15, n. 22, p. 9575-9578, 2014.

DE MARZO, A. M. et al. Inflammation in prostate carcinogenesis. **Nature Reviews Cancer**, v. 7, p. 256-269, 2007.

DIAKOS, C.I. et al. Cancer-related inflammation and treatment effectiveness. **The Lancet Oncology**. v. 15, n. 11, p. e493-503, 2014.

DOAT, S. et al., Nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) and prostate cancer risk: results from the EPICAP study, **Cancer Medicine**., v. 6, p. 2461-2470, 2017.

EL-READI, M. Z. et al. Inhibition of P- glycoprotein activity by limonin and other secondary metabolites from Citrus species in human colon and leukaemia cell lines. **Molecular and Cellular Pharmacology**, v. 626, p. 139-145, 2009.

GIL-ARAUJO, B. et al. Dual specificity phosphatase 1 expression inversely correlates with NF- κ B activity and expression in prostate cancer and promotes apoptosis through a p38 MAPK dependent mechanism. **Molecular Oncology**. v. 8, n. 1, p. 27-38, 2014.

GRIVENNIKOV, S. I.; GRETEN, F. R.; KARIN, M. Immunity, inflammation, and cancer. **Cell**, v. 140, p. 883-899, 2010.

GROSSI, V. et al. p38 α MAPK pathway: A key factor in colorectal cancer therapy and chemoresistance. **World Journal of Gastroenterology**, v. 20, n. (29), p. 9744-9758, 2014.

GUMULEC, J. et al. Modulation of induced cytotoxicity of doxorubicin by using apoferritin and liposomal cages. **International Journal of Molecular Sciences**. v. 15, p. 22960-22977, 2014.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646-674, 2011.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. **Estimativa 2018, Incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro/RJ. Disponível em: <<http://www1.inca.gov.br/inca/Arquivos/estimativa-2018.pdf>> Acesso em: 10 fev. 2018.

KABADERE, S. et al. Licofelone abolishes survival of carcinogenic fibroblasts by inducing apoptosis. **Drug and Chemical Toxicology**, v. 37, n. 1, p. 1-7, 2014.

KOEBERLE, A.; WERZ, O. Multi-target approach for natural products in inflammation. **Drug Discovery Today**, v. 19, p. 1871-1882, 2014.

KUTKOWSKA, J.; STRZADALA, L.; RPAK, A. Synergistic activity of sorafenib and betulinic acid against clonogenic activity of non-small cell lung cancer cells, **Cancer Science**, v. 108, p. 2265-2272, 2017.

KWON, O. J. et al.; ZHANG, L.; ITTMANN, M. M.; LI XIN, L. Prostatic inflammation enhances basal-to-luminal differentiation and accelerates initiation of prostate cancer with a basal cell origin. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 23, p. E592 – E600, 2013.

LI, S.; DAI, W.; MO, W. By inhibiting PFKFB3, aspirin overcomes sorafenib resistance in hepatocellular carcinoma, **International Journal of Cancer**, v. 141, p. 2571-2584, 2017.

LIN, W. W.; KARIN, M. A cytokine-mediated link between innate immunity, inflammation, and câncer. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 117, p. 117-1183, 2007.

LIOU, G-Y. Inflammatory Cytokine Signaling during Development of Pancreatic and Prostate Cancers. **Journal of Immunology Research**, v. 2017, p. 1-10, 2017.

LIU, W. et al. Investigations on cytotoxicity and anti-inflammatory potency of licofelone derivatives. **European Journal of Medical Chemistry**, v. 46, p. 907-913, 2011.

LOWRY, O. H. et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v. 193, n. 1, p. 265-75, 1951.

LU, H.; OUYANG, W.; HUANG, C. Inflammation, a key event in cancer development. **Molecular Cancer Research**, v. 4, p. 221-233, 2006.

MA, L. et al. Association between Tumor necrosis factor-alpha gene polymorphisms and prostate cancer risk: a meta-analysis. **Diagnostic Pathology**, v. 9, p. 1-11, 2014.

MA, Y.; BRUSSELAERS, N. Maintenance use of aspirin or other non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) and prostate cancer risk. **Prostate Cancer and Prostatic Disease**, 2017.

MAHMUD, S.; FRANCO, E.; APRIKIAN, A. Prostate cancer and use of nonsteroidal anti-inflammatory drugs: systematic review and meta-analysis. **British Journal of Cancer**, v. 90, p. 93-99, 2004.

MANJANNA, K. M.; SHIVAKUMAR, B. Licofelone: a novel non-steroidal anti-inflammatory drug (NSAID) in arthritis. **Iranian Journal of Pharmacology and Therapeutics**, v. 10, p. 82-91, 2011.

MICHAELIS, U. R. Mechanisms of endothelial cell migration. **Cellular and Molecular Life Science**, v. 71, n. 21, p. 4131-48, 2014.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, p. 55-63, 1983.

NARAYANAN, N. K. et al. Anticancer effects of licofelone (ML3000) in prostate cancer cells. **Anticancer Research**, v. 27, p. 2393-2402, 2007.

NEUMANN, S. et al. Improved antitumor activity of a therapeutic melanoma vaccine through the use of the dual COX-2/5-LO inhibitor Licofelone. **Frontiers in Immunology**, v. 7, p. 537, 2016.

NOGUEIRA, R. B. et al. Imunoexpressão das proteínas COX-2, p53 e caspase-3 em adenoma colorretal e mucosa não neoplásica. **Einstein**, v. 11, p. 456-461, 2013.

PARK, K. et al. Regulation of proinflammatory mediators via NF- κ B and p38 MAPK-dependent mechanisms in RAW 264.7 macrophages by polyphenol components isolated from Korea *Lonicera japonica* THUNB. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2012, p. 1-10, 2012.

PAYANDEMEHR, B. et al. A COX/5-LOX inhibitor licofelone revealed anticonvulsant properties through iNOS diminution in mice. **Neurochemical Research - Springer**, v. 40, p. 1819-1828, 2015.

PETRYLAK, D. P. et al. Docetaxel and prednisone with or without lenalidomide in chemotherapy-naïve patients with metastatic castration resistant prostate cancer (MAINSAIL): a randomised, double-blind, placebo-controlled phase 3 trial. **The Lancet**, vol. 16, p. 417-425, 2015.

PINHEIRO, M. M. G. et al. Anti-inflammatory activity of ethanol extract and fractions from *Couroupita guianensis* Aublet leaves. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 146, p. 324-330, 2013.

POORNIMA, P. et al. Doxorubicin induced apoptosis was potentiated by neferine in human lung adenocarcinoma, A549 cells. **Food and Chemical Toxicology**, v. 68, p. 87-98, 2014.

RAI, Y. et al. Mitochondrial biogenesis and metabolic hyperactivation limits the application of MTT assay in the estimation of radiation induced growth inhibition. **Scientific Reports**. v. 8, n. 1, p. 1531, 2018.

RAMOS-MONTOYA, A. et al. HES6 drives a critical AR transcriptional programme to induce castration-resistant prostate cancer through activation of an E2F1-mediated cell cycle network. **EMBO Molecular Medicine**, v. 6, p. 651–661, 2014.

RICOTE, M. et al.; P38 MAPK protects against TNF- α -provoked apoptosis in LNCaP prostatic cancer cells. **Apoptosis**, v. 11, p. 1969-1975, 2006.

RODNEY, T.; OSIERB, N.; GILLB, J. Pro- and anti-inflammatory biomarkers and traumatic brain injury outcomes: A review. **Cytokine**, p. 1-9, 2018..

RUONARAIN, C. et al. Colon cancer: genetics and apoptotic events. **Journal of Biological Chemistry**, v. 385, p. 449-464, 2004.

SCHINDLER, J. F.; MONAHAN, J. B.; SMITH, W. G. p38 Pathway kinases as antiinflammatory drug targets, **Journal of Dental Research**., v. 86, p. 800–811, 2007.

SHU Y. et al. MiR-204 enhances mitochondrial apoptosis in doxorubicintreated prostate cancer cells by targeting SIRT1/p53 pathway. **Oncotarget**, v. 8, n. 57, p. 97313-97322, 2017.

SECRETARIA ESTADUAL DA SAÚDE, GOVERNO DO RIO GRANDE DO SUL/BRASIL. **Nota conjunta sobre rastreamento de Câncer de Próstata**. Disponível em:

<http://www.saude.rs.gov.br/conteudo/9736/?Nota_conjunta_sobre_rastreamento_de_C%C3%A2ncer_de_Pr%C3%B3stata> Acesso em: 27 jul. 2016.

SFANOS, K. S.; DE MARZO, A. M. Prostate cancer and inflammation: the evidence. **Histopathology**, v. 60, n. (1), p. 199–215, 2012.

SHARMA, S. et al. Chemopreventive efficacy and mechanism of Licofelone in a mouse lung tumor model via aspiration. **Cancer Prevention Research**. v. 4, n. 8, p.1233-1242, 2011.

SHI, Q. et al. KLF5 promotes apoptosis induced by phorbol ester as an effector of the autocrine factor TNF α in LNCaP prostate cancer cells. **Oncology Letters**. v. 14, p. 1847-1854, 2017.

SILVA, A. E.; SERAKIDES, R.; CASSALI, G. D. Carcinogênese hormonal e neoplasias hormônio-dependentes. **Ciência Rural**, v. 34, n. 2, p. 625-633, 2004.

STEWART, B. W.; WILD, C. P. (Ed.). **World Cancer Report: 2014**. Lyon: IARC, 2014.

TAVOLARI, S. et al. Licofelone, a dual COX-2/5-LOX inhibitor, induced apoptosis in HCA-7 colon cancer cells through the mitochondrial pathway independently from

its ability to affect the arachidonic acid cascade. **Carcinogenesis**. v. 28, n. 2, p. 371-380, 2008.

TONON, T. C. A.; SCHOFFER, J. P. F. Câncer de próstata: uma revisão da literatura. **Revista Saúde e Pesquisa**, v. 2, n. 3, p. 403-410, 2009.

VALVERDE, A. et al. The addition of celecoxib improves the antitumor effect of cetuximab in colorectal cancer: role of EGFR-RAS-FOXM1- β -catenin signaling axis. **Oncotarget**, v. 8, n. 13, p. 21754-21769, 2017.

VOLP, A. C. P. et al. Efeitos antioxidantes do selênio e seu elo com a inflamação e síndrome metabólica. **Revista de Nutrição**, v. 23, p. 581-590, 2010.

WANG, Z. et al. Nitidine chloride inhibits LPS-induced inflammatory cytokines production via MAPK and NF-kappaB pathway in RAW 264.7 cells. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 144, p. 145-150, 2012.

WROCLAWSKI, M. L.; NETO, A. S. Urologia Fundamental. **Sociedade Brasileira de Urologia**, São Paulo/SP. cap. 47, p. 409-414, 2010.

WU, Y. et al. Associations of genetic variation in CASP3 gene with noise-induced hearing loss in a Chinese population: a case-control study. **Environmental Health**, v. 16, n.: 78, p. 1-8, 2017.

YANG, M. -C., et al. Bim directly antagonizes Bcl-xl in doxorubicin-induced prostate cancer cell apoptosis independently of p53. **Cell Cycle**. v. 15, n. 3, p. 394-402, 2016.

YAO, L. et al. The function and mechanism of COX-2 in angiogenesis of gastric cancer cells. **Journal of Experimental & Clinical Cancer Research**. v. 30, n. 13, p. 1-5

YI FANG, Y. et al. Associations of Caspase-3 gene polymorphism with lumbar disc herniation. **Kaohsiung Journal of Medical Sciences**, v. 32, p. 552-558, 2016.

ZARUBIN, T.; HAN J. Activation and signaling of the P38 MAP kinase pathway. **Cell Research**, v. 15, p. 11-18, 2005.

ZELENAY, S. et al.; Cyclooxygenase-dependent tumor growth through Eevasion of immunity. **Cell**, v. 162, p. 1257-1270, 2015.